

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL

TESIS DOCTORAL

María Dolores Mendoza Cembranos

Servicio de Dermatología

Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma.

Madrid, 2020

Dirigida por: **Luis Requena Caballero y Miguel Ángel Piris Pinilla**

TESIS DOCTORAL

CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL

María Dolores Mendoza Cembranos
Doctorado en Medicina y Cirugía
Universidad Autónoma de Madrid

Introducción:

El carcinoma de células de Merkel (CCM) es un tumor neuroendocrino primariamente cutáneo muy agresivo, con un alto índice de morbimortalidad. La incidencia es muy baja, aunque se está incrementando en las últimas décadas. Se localiza en áreas de piel fotoexpuestas de población anciana. El poliomavirus del carcinoma de células de Merkel (MCPyV) es el agente causal de una gran parte de los casos.

Material y métodos:

Estudio retrospectivo multicéntrico de 219 casos de CCM procedentes de diferentes hospitales de España y Alemania confirmados histopatológicamente. Se realizó revisión y análisis de diferentes variables clínicas (sexo, edad, localización, inmunosupresión asociada, fecha de diagnóstico, estadio, tratamiento, estado actual de los pacientes, supervivencia libre de enfermedad, supervivencia hasta la primera progresión) e histopatológicas (subtipo histopatológico, profundidad de infiltración, caso clásico o combinado, necrosis, regresión, epidermotropismo, invasión linfovascular, patrón de crecimiento, neoangiogénesis, infiltración linfocitaria), así como el estudio a partir de micromatrices tisulares de los componentes celulares del estroma, marcadores tumorales y del inmunofenotipo del infiltrado (MCPyV, PD1, PDL1, FOXP3, ROR gamma, CD20, CD4, CD8, CD3, granzima, perforina, TIA1, CD68, CD163, P53, Rb, CK20, CD56, PAX 5, sinaptofisina, cromogranina, Ki 67, HLA I, HLA II, ALK y EZH2).

Resultados:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos MCPyV positivos y negativos para todos los marcadores, excepto CD8, PDL1 en el tumor, HLAII y CD163. Los casos con regresión presentaban mayor expresión de FOXP3, CD20, PD1, PDL1, CD163 y CD68 en el infiltrado. Se observó una relación directa entre positividad de p53 y la ausencia de regresión. En cuanto a la supervivencia global se observó una relación directa con la edad y el estadio tumoral, ya que cuando más avanzados eran el estadio tumoral y la edad del paciente, peor era la supervivencia global. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de CD163, ALK y EZH2, ya que la falta de expresión de estos marcadores se asociaba con una peor supervivencia. En cuanto a la supervivencia ligada al tumor, se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a estadio clínico, y la expresión de CD4, CD163, TIA1, FOXP3, ALK, EZH2 y la presencia de necrosis, con una mejor supervivencia en relación con la positividad de CD4, CD163, TIA1, FOXP3, ALK y EZH2 y peor supervivencia cuando existía necrosis en los islotes tumorales.

Conclusiones:

La presencia de MCPyV en el CCM se asocia con cambios en los perfiles de expresión inmunohistoquímica de estos tumores, tanto en las células neoplásicas como en la composición celular del estroma tumoral.

Se han definido los siguientes criterios de regresión histológica en CCM: Infiltrado linfocitario intratumoral, presencia de colágeno esclerótico, positividad para marcadores citotóxicos o de apoptosis. Los casos con regresión presentan cambios en la composición celular del estroma (mayor expresión de los marcadores linfocitarios e histiocitarios), así como ausencia de expresión de p53. Se observó también una tendencia de estos casos a mostrar una mayor supervivencia.

Se han encontrado múltiples datos clínicos y marcadores moleculares relacionados con el curso clínico. Así:

1. Edad elevada y estadio avanzado se asocia directamente con supervivencia más corta
2. Una escasa o nula expresión de CD163, CD4, FOXP3 y TIA1 se asocia con peor supervivencia
3. La expresión débil o ausente de ALK y EZH2 por parte de las células tumorales se asocia con peor supervivencia

Después de análisis multivariante, se integraron las diversas variables en un factor numérico denominado riesgo global [Score global = Score (ALK) + Score (TIA 1) + Score (CD 163)], que permitió clasificar los pacientes en grupos con distintas probabilidades de supervivencia.

A Dani, Ignacio y Pedro, mis mejores regalos

AGRADECIMIENTOS:

A Pedro y a Ignacio. Desde que llegasteis a mi vida ya no miro nada con el mismo prisma. Gracias por enseñarme a soñar.

A Dani por acompañarme en este camino con paciencia y apoyo incondicional a pesar de las continuas carreras y de mis “locuras”.

A mis padres, por ser infatigables, por estar siempre ahí dispuestos a echar una mano. Sin vosotros mucho no habría sido posible.

A mis hermanos, porque todos me habéis ayudado en este proyecto.

A Luis Requena, por enseñarme cada día con humildad y cercanía. Por ser familia además de maestro.

A Miguel Ángel Piris por su paciencia cuando las cosas iban más lentas de lo esperado, por su sabiduría para guiarme en cada momento, por sus consejos. Por estar siempre, siempre disponible.

A Carlos Santonja, por su dedicación, sin él no habría sido nada posible.

A Laura Cereceda porque siempre me ha ayudado desde el principio de este proyecto. En los buenos y en los malos momentos. Cuando había tiempo y cuando no había tanto. Por su complicidad y por su “hombro y mano” amigas.

A Raquel Pajares, Jenny y todo el equipo de inmuno que, a pesar de estar hasta arriba de trabajo y meterles prisa, siempre estaban con una sonrisa.

A todos los compañeros que habéis contribuido mandando casos clínicos, bloques, Dr. Kutzner, Dres. Nicolás Pena, Dra. González Vela, Dr. Vaqué.

A las Dras. Carla Ferrándiz y Beatriz Llombart por sus palabras expertas, consejos y ánimos a lo largo de este proyecto.

Al equipo de derma de la FJD, todos y cada uno habéis contribuido de una forma u otra a que este trabajo se complete, por estar siempre disponibles, por ser COMPAÑEROS y algo más, por vuestra paciencia con mis agobios, por las correcciones en las sesiones monográficas según iba avanzando, la lectura de las fases previas, la lectura de tablas de Excel, las fotos y correcciones a última hora, y sobre todo por vuestros ánimos en momentos de desaliento y por vuestro cariño incondicional.

A mis amigas y amigos por estar siempre ahí.

A todos los que habéis formado parte activa o pasiva de este proyecto. Gracias.

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL
TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____ **María Dolores Mendoza Cembranos** _____, estudiante en el Programa de Doctorado _____ **MEDICINA Y CIRUGÍA** _____, de la Facultad de _____ **MEDICINA** _____ de la Universidad Autónoma de Madrid, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL y dirigida por: **LUIS REQUENA CABALLERO Y MIGUEL ÁNGEL PIRIS PINILLA**

DECLARO QUE: La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita. Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 15 de __DICIEMBRE__ de 2020__

Fdo.:

María Dolores Mendoza

ÍNDICE

Indice

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. EPIDEMIOLOGÍA-INCIDENCIA.....	10
1.2. HISTOGÉNESIS/CÉLULA DE ORIGEN	12
1.3. ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO.....	15
a) Radiación UV	15
b) Inmunosupresión	16
c) Poliomavirus.....	17
1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	22
1.5. HISTOPATOLOGÍA.....	24
Subtipos histopatológicos.....	24
Epidermotropismo	25
Carcinoma de Merkel intraepidérmico	25
Invasión linfática	26
CCMs combinados.....	26
Neoangiogénesis	27
Infiltrado inflamatorio	28
Regresión	30
Diagnóstico diferencial histopatológico	31
1.6. MARCADORES TUMORALES Y DEL ESTROMA	31
Marcadores linfocitarios:.....	33
Marcadores histiocitarios:	36
Marcadores de apoptosis y citotóxicos:	36
Otros marcadores:	37
H3K27me3:	37
ALK (“Anaplastic Lymphoma Kinase”)	38
HLA1 y HLA2.....	40
1.7. ESTUDIO CITOGENÉTICO Y MOLECULAR	40
1.8. ESTADIFICACIÓN.....	40
1.9. FACTORES PRONÓSTICOS	42
a. Características del paciente.	42
b. Virus.....	43
c. Estado inmune/infiltrado inflamatorio	44

d. Características histopatológicas.....	44
e. Otros	44
1.10. TRATAMIENTO	45
a. Cirugía:.....	45
b. Radioterapia:.....	46
c. Quimioterapia:	46
d. Inmunoterapia:	47
2. HIPÓTESIS DE ESTE ESTUDIO	51
3. OBJETIVOS.....	51
4. MATERIAL Y MÉTODOS	53
Procedencia de los casos:.....	53
1. Clínica:	54
2. Histopatología:.....	56
3. Inmunohistoquímica:	68
4. Secuenciación genómica masiva de una serie de casos	74
5. Análisis estadístico:	75
6. Aspectos éticos:	77
5. RESULTADOS	79
5. 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE:	79
a. Variables clínicas	79
b. Variables histopatológicas	86
c. Variables inmunohistoquímicas	88
d. Pronóstico	92
5. 2. DIFERENCIAS ENTRE LOS CASOS POLIOMAVIRUS POSITIVOS Y NEGATIVOS	93
a. Variables histopatológicas.	93
b. Variables inmunohistoquímicas:	95
c. Supervivencia ligada a tumor.	105
5.3. REGRESIÓN HISTOPATOLÓGICA	106
Marcadores propios del tumor:	107
Marcadores del estroma:	108
5. 4. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LA SUPERVIVENCIA LIGADA AL TUMOR.....	110
1. Supervivencia global.....	110
2. Supervivencia ligada al tumor	114

5. 5. SCORES Y NOMOGRAMA CON PROBABILIDAD DE SUPERIVENCIA PRESENTANDO UNAS DETERMINADAS VARIABLES	123
5.6. DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS DE CASOS SECUENCIADOS.....	127
5. 7. RESUMEN DE RESULTADOS MÁS SIGNIFICATIVOS.....	130
1. Análisis descriptivo:.....	130
2. Diferencias entre los MCPyV positivos y negativos:.....	130
3. Diferencias entre los casos con regresión frente a los casos sin regresión:	131
4. Supervivencia global:.....	132
5. Supervivencia ligada a tumor:.....	132
6. DISCUSIÓN	134
6.1. Expresión de ALK en las células tumorales del CCM	136
6.2. Expresión de EZH2 en las células tumorales del CCM	137
6.3. Expresión de TP53 en las células tumorales del CCM	137
6.4. Expresión de PAX5 en las células tumorales del CCM.....	137
6.5. Expresión de PDL1 Y PD 1 en CCM	138
6.6. Determinación de la expresión de MCPyV:	139
6.7. Diferencias entre CCM MCPyV positivos y negativos:.....	141
6.8. Cambios en el estroma inmune asociados con la presencia de MCPyV.....	145
6.9. Posible evasión inmune con disminución de expresión de HLA I.	147
6.10. Diferencias entre los casos con regresión frente a los casos sin regresión:	148
6.11 Estudio de supervivencia global:.....	150
6.12. Supervivencia ligada a tumor:.....	151
6.13. Limitaciones:	153
6.14. Futuro:	154
7. CONCLUSIONES.....	157
8. BIBLIOGRAFÍA.....	159

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células de Merkel (CCM) es un tumor maligno neuroendocrino, primariamente cutáneo. Es un tumor muy poco frecuente, aunque su incidencia está en aumento en las últimas décadas. Suele presentarse en áreas fotoexpuestas de pacientes ancianos. Tiene un curso evolutivo muy agresivo, con alto riesgo de recurrencia y de metástasis. Más de un tercio de los pacientes fallecen por este tumor, siendo dos veces más letal que el melanoma. A pesar de ser un tumor infrecuente constituye la tercera causa de mortalidad por cáncer cutáneo tras el melanoma y el carcinoma epidermoide.

Fue descrito inicialmente por Toker (1) en 1972 como “carcinoma trabecular de la piel”. Posteriormente Tang y Toker (2) realizaron un estudio ultraestructural hallando semejanzas fenotípicas (gránulos neurosecretorios) entre las células del CCM y las células de Merkel de la piel.

1.1. EPIDEMIOLOGÍA-INCIDENCIA

Es difícil establecer la verdadera incidencia a lo largo de los años del CCM ya que, desde su descripción original en 1972, se han utilizado distintos sinónimos para nombrar esta neoplasia. Además, la primera clasificación internacional de patología oncológica (1976-1989) no contenía códigos específicos para el CCM. En la segunda edición se introdujeron dos códigos: Uno para carcinoma neuroendocrino y otro para el CCM (3). Por lo tanto, para analizar tendencias en el cambio de la epidemiología debemos comenzar a partir de 1990.

La incidencia varía según las regiones. Según RARECARE (registro europeo de cáncer infrecuente en Europa) el CCM tuvo una incidencia de 0.13 casos por 100.000 habitantes entre 1995 y 2002.

En Europa, el CCM supone menos del 1% de las neoplasias malignas cutáneas, pero su incidencia se está incrementando de forma muy significativa y supone la tercera causa de mortalidad debida a cáncer cutáneo. En Estados Unidos se ha descrito una incidencia de 2488 casos durante el año 2013 (4).

Solo existe un trabajo describiendo la incidencia del CCM en España (5,6), que se circunscribe a la provincia de Gerona, y describe una tasa de incidencia bruta de 0,28 (IC 95%: 0,15-0,4) por 100.000 personas-año y, estandarizada con la población mundial, de 0,12 (IC 95%: 0,04-0,2) por 100.000 personas-año.

La mayor incidencia del CCM se ha descrito en Australia (7) (1.6/100.000 personas-año), con un aumento importante de los casos poliomavirus-negativo, seguramente a causa de la radiación ultravioleta.

Se estima que la incidencia de este tumor se ha multiplicado por 4 en los últimos 20 años, probablemente debido al aumento de los factores de riesgo como la mayor esperanza de vida con incremento de personas de edad avanzada, la exposición a la radiación ultravioleta y la inmunosupresión. También influye la mejoría en las técnicas de diagnóstico, sobre todo en las técnicas inmunohistoquímicas, y la generalización del estudio de la CK20.

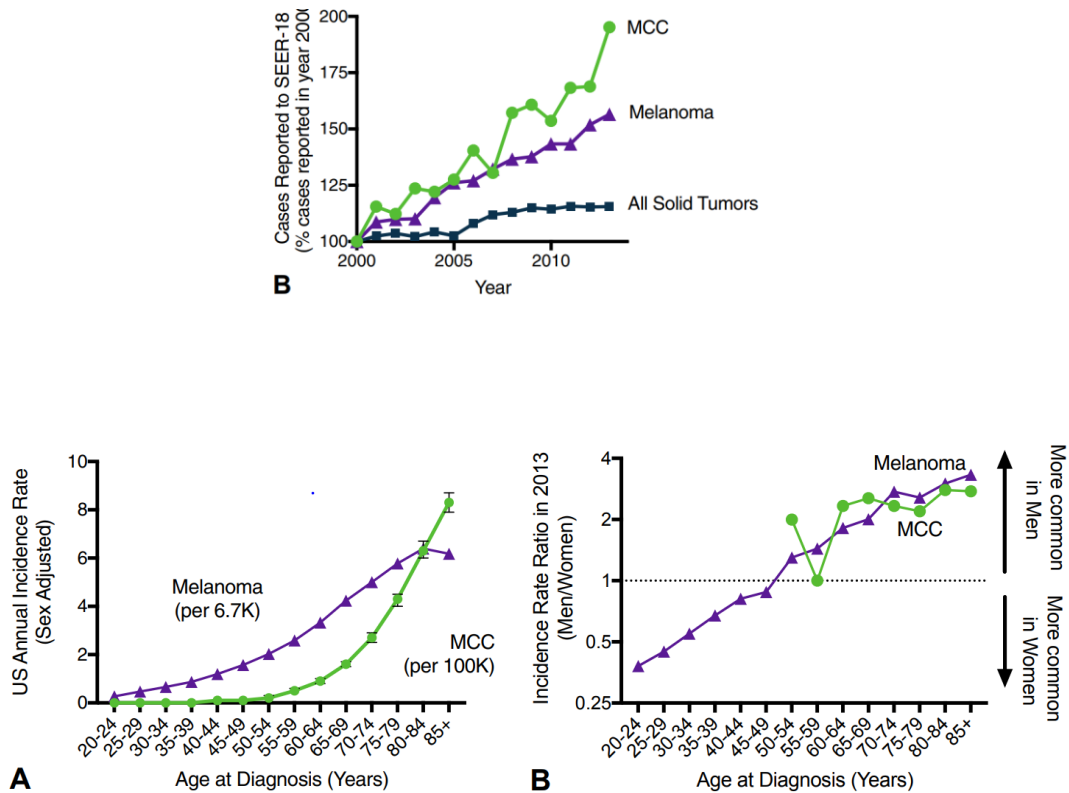


Fig. 1. En estas figuras, tomadas del trabajo publicado por Paulson et al. (4), podemos ver la incidencia creciente en los últimos años y el aumento de casos en pacientes ancianos.

El 90% de los CCM se desarrollan en pacientes mayores de 50 años y la incidencia aumenta en relación directa con la edad, debido posiblemente a la inmunosenescencia. La edad media en el momento del diagnóstico está entre 75 y 80 años. La radiación ultravioleta está directamente relacionada con la incidencia de CCM. De forma excepcional hay algún caso descrito en edad pediátrica (8).

1.2. HISTOGÉNESIS/CÉLULA DE ORIGEN

Las células de Merkel o “células táctiles” fueron descritas por primera vez en 1896 por Friedrich Merkel (9), y se encuentran en la capa basal de la epidermis y del epitelio folicular, donde tienen un papel importante en la recepción del estímulo sensorial fino.

Las células de Merkel se comportan como osmorreceptores y mecanorreceptores, y se encargan de la sensibilidad fina, la síntesis de somatostatina y otros efectos endocrinos y paracrinós, por lo que pertenecen al sistema de células neuroendocrinas (10,11).

Sin embargo, se desconoce si el origen del CCM es a partir de células de Merkel normales o existe algún otro precursor de este tumor. En la mayoría de las ocasiones el CCM se encuentra localizado en la dermis, pero se puede encontrar en cualquier estrato cutáneo, desde la epidermis hasta el tejido celular subcutáneo.

Debido a la similitud inmunofenotípica y ultraestructural de las células tumorales y las células de Merkel, inicialmente se pensó que éstas eran las células en las que se originaba el tumor. Pero existen algunos hallazgos que hacen pensar que puede existir otro precursor (12):

- a) La localización del CCM suele ser dérmica o hipodérmica, mientras que las células de Merkel están situadas entre los queratinocitos de la hilera basal de la epidermis o la vaina radicular externa del folículo piloso.
- b) El patrón de expresión de CK20 es diferente en las células de Merkel (patrón difuso) y en el CCM (patrón en glóbulo paranuclear)
- c) Las células de Merkel normales ya están diferenciadas y tienen un índice de recambio muy lento.

Una posible hipótesis histogenética sería que existiese un precursor de célula de Merkel, por ejemplo células madre epidérmicas o dérmicas, que fueran la célula precursora del CCM (13). Se postula que estas características fenotípicas de

células de Merkel sean adquiridas tras su transformación neoplásica. Comparando con otros tumores en el que los virus tienen un potencial oncogénico claro (HPV, HHV8), puede suceder que el virus transforme la célula y por lo tanto el inmunofenotipo no necesariamente sea indicativo del origen celular (14,15).

Debido a la expresión en las células tumorales del CCM de PAX5, TdT y diversas inmunoglobulinas, marcadores que habitualmente solo se expresan en linfocitos B precursores, se ha postulado que las células pre-/pro-B sean las células precursoras del CCM (16). Los fibroblastos dérmicos también pueden ser infectados por poliomavirus. La inducción de genes que codifican metaloproteasas por la vía WNT/beta catenina, la edad avanzada y la radiación ultravioleta, pueden facilitar la infección de poliomavirus en los fibroblastos y desarrollar el CCM (17).

Es posible que los casos positivos para poliomavirus (MCPyV +) y los casos negativos para poliomavirus (MCPyV –) tengan precursores diferentes. En este sentido, es posible que los CCM MCPyV negativo procedan de un precursor en la epidermis, por ello tienen mayor frecuencia de casos combinados con carcinomas epidermoides y enfermedad Bowen y tienen una alta carga mutacional, con expresión de Rb y p53. Mientras que los casos MCPyV positivo procederían de un precursor en la dermis que se infecte por MCPyV, y estas células se transdiferenciarían y darían lugar a células similares a las células de Merkel (Fig.2).

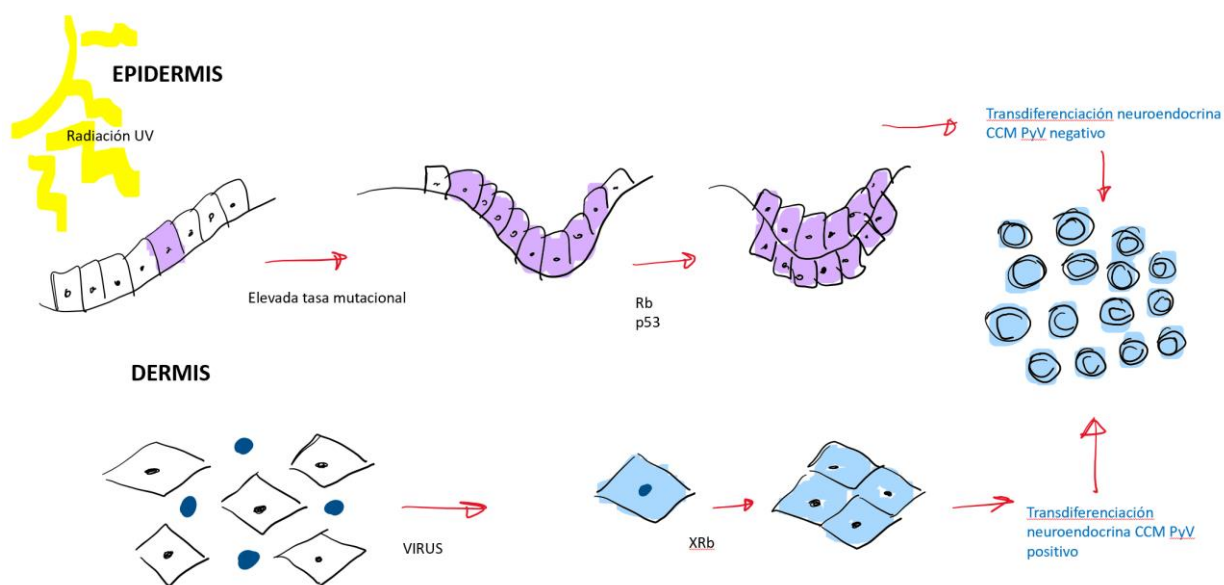


Fig. 2. Figura explicativa de cómo se origina un CCM positivo o negativo para MCPyV (12).

1.3. ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO

a) Radiación UV

El CCM se presenta con mayor frecuencia en pacientes de raza blanca (el 95% de los pacientes son caucásicos), fototipo claro y en áreas fotoexpuestas (18). Habitualmente los pacientes han presentado previamente otros tumores asociados a radiación ultravioleta. Los pacientes con psoriasis que han sido tratados con psolarenos y UVA tienen un riesgo 100 veces mayor de desarrollar carcinoma de células de Merkel que la población general (19).

Los pacientes que han tenido melanoma tienen un riesgo 3 veces mayor de presentar un CCM.

b) Inmunosupresión

La inmunidad juega un papel crucial en el CCM. Esta neoplasia es más frecuente en pacientes inmunodeprimidos. En este grupo de pacientes se presenta en edades más tempranas y tiene peor pronóstico.

La incidencia de CCM en pacientes inmunodeprimidos varía según las series, pero se estima que un 10% de los CCM se desarrollan en pacientes con algún tipo de inmunosupresión (20).

Se consideran pacientes inmunodeprimidos tanto pacientes con tratamientos farmacológicos inmunosupresores crónicos como pacientes con otras inmunosupresiones: leucemia linfocítica crónica, infección por VIH (10-13 veces más probable tener un CCM), enfermedades autoinmunes, exposición crónica a arsénico o trasplantados (21).

El predominio de CCM en población anciana sugiere que la inmunosenescencia tenga un papel patogénico importante (22).

Los pacientes inmunodeprimidos tienen peor supervivencia global y peor supervivencia ligada al tumor con respecto a los pacientes inmunocompetentes. En un trabajo recientemente publicado (20) se compara la supervivencia dependiendo del tipo de inmunosupresión que presente el paciente. Los pacientes con infección por VIH y trasplantados presentaron edades más tempranas en el momento del diagnóstico y se diagnosticaron en estadios más avanzados.

c) Poliomavirus

El poliomavirus es el agente causal de la mayoría de los CCM, entre un 49% y un 89% según las series. Esto sugiere la gran importancia del sistema inmune en esta neoplasia.

Feng et al. (23) en el año 2008 descubrieron un producto de transcripción formado por un antígeno T desconocido y una tirosín-fosfatasa humana en las células tumorales del CCM, lo que llevó a secuenciar por primera vez el genoma de un poliomavirus (23).

Este virus estaba presente en 8 de 10 tumores (80%) y sólo en el 8% de los controles. En 6 de los tumores el ADN estaba integrado en el genoma con un patrón clonal, indicando que la replicación viral precedía a la expansión clonal de las células tumorales.

La familia *poliomaviridae* son virus de doble cadena pequeños a los que pertenece el poliomavirus, incluye otros poliomavirus asociados con infecciones cutáneas como la tricodisplasia espinulosa (poliomavirus 6 y 7) o enfermedades sistémicas (poliomavirus JC, poliomavirus BK, poliomavirus WU y poliomavirus KI) (24).

Hasta la fecha, MCPyV es el único oncovirus de la familia de los poliomavirus y aún se desconoce qué factor lo distingue de los demás. La prevalencia de la infección subclínica aumenta con la edad, con una seroprevalencia en adultos entre un 60% y un 80% (25). La piel es el órgano que se infecta con mayor frecuencia, pero también se ha detectado en sangre y en otros órganos. La infección por MCPyV es asintomática. Aún no está claro cuál es el huésped.

Quizás los monocitos de sangre periférica pueden ser el reservorio de la infección. MCPyV pueden infectar múltiples células, incluyendo a los queratinocitos. Los fibroblastos y células HEK 293 son las únicas células en las que se ha demostrado la infección viral in vitro.

El ciclo vital del MCPyV es similar al de otros poliomavirus. El genoma viral tiene una región temprana (ER) y otra región tardía (LR) que tiene genes que codifican proteínas que coordinan la replicación viral y proteínas de la cápside respectivamente (Fig. 3).

La transformación oncogénica de las células infectadas por el virus requiere dos eventos: integración del virus en el genoma y truncamiento del antígeno largo para evitar la replicación.

Los genes localizados en la región temprana codifican el antígeno mayor (LT) y el antígeno menor (ST). Los genes localizados en la región tardía (LR) codifican proteínas de la cápside.

LT y ST tienen diferentes mecanismos oncogénicos y se requieren ambos para el desarrollo del tumor. La integración del virus en el genoma puede suceder de forma accidental por la fragmentación del genoma durante la replicación de MCPyV.

El lugar exacto de la integración parece ser aleatorio, sin una respuesta específica celular con genes supresores de tumores u oncogenes.

En los CCM positivos para MCPyV, las mutaciones de gp3 en MCPyV que codifica LT alteran el dominio de la helicasa distal a la proteína asociada a retinoblastoma (RB). La LT truncada resultante puede unirse a RB para seguir

con el ciclo celular pero no puede mediar la replicación viral. El viroma integrado y mutado ya no puede producir más viriones de MCPyV. La baja probabilidad de que esto ocurra podría explicar la poca frecuencia del CCM a pesar de la aparente ubicuidad de la infección por MCPyV.

LT y ST ejercen diversas acciones que pueden contribuir a la oncogénesis. Los cultivos celulares dependen de estos dos antígenos para que la célula prolifere y sobreviva.

La región amino-terminal del antígeno T viral se encarga de la replicación y de la proliferación celular. El antígeno T SV40 se une e inactiva a RB. (Fig. 3)

Esta interacción incrementa la expresión de la oncoproteína, que puede ser una diana terapéutica para los CCM positivos para MCPyV. En cambio, este antígeno SV40 MCPyV no se une directamente a p53. También se puede asociar con la proteína Vam6/Vps39, que tiene una importancia crucial para la replicación viral. Otras funciones de LT que se pierden después del truncamiento son la capacidad de unirse al DNA, de unirse a la proteína 4 de los bromodominios (BRD4), de actividad helicasa y de inhibición del crecimiento celular.

Muchas líneas de investigación sugieren que ST juega un papel primordial en la oncogénesis de los CCM positivos para MCPyV. La expresión de ST es suficiente para transformar fibroblastos en un cultivo celular. Los estudios realizados en modelos de ratones transgénicos indican que la expresión de ST transforma varios órganos y sistemas, incluyendo la epidermis. En modelos murinos la sola presencia de los antígenos T del virus no es suficiente para generar carcinomas neuroendocrinos. Sin embargo, la co-expresión de ST con el factor de transcripción ATOH1 genera proliferaciones intraepidérmicas similares a CCM, y con la pérdida de TP53, tumores anaplásicos indiferenciados.

ST tiene un rango amplio de actividad celular. Al igual que otros antígenos pequeños, el ST del MCPyV tiene una región PP2A que se une e inhibe varios componentes de los complejos serina/treonina fosfatasa PP2A y PP4. La interacción de ST y PP4 puede mediar la inhibición de la vía del factor nuclear Kappa B (NF.Kb), así como promover la motilidad celular mediante efectos en el citoesqueleto de la actina y de los microtúbulos. El ST del MCPyV tiene un dominio que se conoce como estabilizador (LSD) y se ha propuesto como inhibidor de la actividad de varias ubiquitin-ligasas. La ubiquitin-ligasa E3, regula el ciclo de progresión celular y otros procesos teniendo como dianas específicas proteínas de degradación. ST se puede unir e inhibir a (FBXW7), componente de SKP-CUL1F, lo que desencadena una reducción en la degradación de varias oncoproteínas. La co-expresión de LT y ST lleva a la estabilización de LT, que puede estar mediado por la inhibición de FBXW7 por ST para prevenir la degradación de LT por la ubiquitin-ligasa E3.

Otras proteínas oncogénicas, incluyendo MYC, pueden ser estabilizadas por ST por mecanismos similares. La interacción del dominio LSD con la proteína 20 homóloga de la división del ciclo celular (CDC20), un activador del complejo promotor de la anafase (también conocido como ciclosoma), se ha descrito como factor desencadenante de una serie de eventos de señalización que acaban en la inhibición de la fosforilación de la proteína de unión del factor de iniciación eucariota de translación (4E-BP1), lo que lleva a la codificación del ARN mensajero, con el potencial efecto en la supervivencia. El dominio LSD se requiere para la activación oncogénica in vivo e in vitro, lo que da un papel crítico a este dominio para el desarrollo del CCM ligado a MCPyV. El antígeno ST se une a L-MYC para regular la histona EP400 acetiltransferasa y el complejo

remodelador de la cromatina. (Fig. 3) Actividades adicionales que realiza ST son la de aumentar la glucólisis anaerobia y posibilitar la vía de señalización de MYC y/o NF-KB.

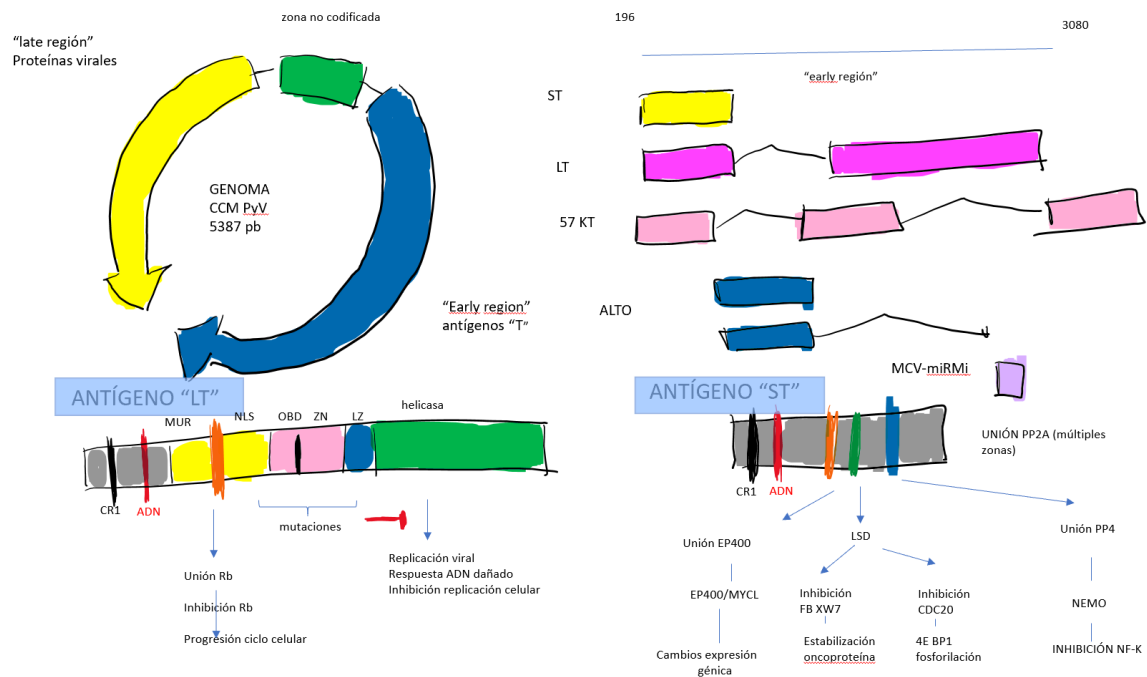


Fig. 3. Esquema que explica el MCPyV. Tomada de (24).

Existen varias técnicas para detectar el virus en el tumor, que incluyen inmunohistoquímica, PCR, FISH y secuenciación masiva. Estos métodos varían en sensibilidad y especificidad.

La **inmunohistoquímica** (IHQ) mide la expresión del antígeno T viral. El anticuerpo más utilizado es el CM2B4, que tiene un 88% de sensibilidad y un 94% de especificidad, comparado con el uso combinado de IHQ y PCR. Se puede encontrar tinción no específica en tejido linfoide y amigdalario.

La **PCR** detecta el exón 5' del LT. La amplificación mediante PCR de este exón tiene un 83% de sensibilidad y un 81% de especificidad. Se puede mejorar esta

sensibilidad si nos dirigimos a MCPyV gp4 que codifica ST. La PCR cuantitativa puede detectar el número de copias virales.

Se ha propuesto que la combinación de IHQ y PCR puede ser el método más sensible y específico para determinar la carga viral del tumor (26).

La hibridación *in situ* de RNA tiene sensibilidad y especificidad similar a la PCR. La secuenciación es más específica, pero no compensa por el coste económico, el tiempo y en nivel de experiencia que requiere.

Hasta la fecha no hay un método estandarizado para determinar el estado viral del tumor, ni siquiera hay consenso en qué método es el más adecuado para aplicar en la práctica clínica habitual.

1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La apariencia clínica del CCM es muy variada. Se presenta como una lesión de rápido crecimiento, habitualmente única, como una tumoración cutánea o subcutánea que se localiza habitualmente en piel fotoexpuesta. Las lesiones suelen ser asintomáticas, de consistencia firme, de coloración eritemato-violácea (27,28), que en ocasiones se pueden confundir con lesiones benignas, como quistes o lesiones inflamatorias. En ocasiones la lesión se presenta como una placa única dérmica o subcutánea, como una placa multinodular y, de manera menos frecuente, como una lesión multifocal o diseminada (29).

El tamaño medio de la tumoración es de 2-4 cm en el momento del diagnóstico. En lesiones de gran tamaño en ocasiones se observa la presencia de un halo inflamatorio eritematoso peritumoral. En la histopatología de estas áreas se

suele observar la presencia de invasión vascular, por lo que es considerado un signo clínico de mal pronóstico.

El CCM es más frecuente en áreas fotoexpuestas. Las mucosas se afectan con muy baja frecuencia. Su localización más frecuente es la cabeza y el cuello, en aproximadamente un 50% de los casos, seguido de las extremidades en un 40% y un 10% en el tronco y en la región glútea. La región periorbitaria es una localización muy frecuente (10%), y en esta localización se suele confundir con un proceso benigno tipo quiste o chalazión. En raras ocasiones se ha descrito en zonas no expuestas como la mucosa genital, perianal y orofaríngea.

Se han descrito casos de CCM localizados en ganglio linfático en ausencia de tumor primario en la piel, lo que representa aproximadamente un 15% de los casos en series amplias. Parece ser que estos CCM primarios ganglionares tienen un mejor pronóstico que los primarios cutáneos con afectación ganglionar (30).

Heath et al. (31) describieron el acrónimo AEIOU (*asymptomatic/lack of tenderness, expanding rapidly, immune suppression, older than age 50, and uV-exposed site*) para definir las características clínicas de este tumor (asintomático, rápido crecimiento, inmunodeprimidos, ancianos y fotoexpuestos a radiación ultravioleta). En el estudio que publicaron con 195 pacientes, el 89% presentaba estas características.

Para confirmar el diagnóstico se requiere el estudio histopatológico e inmunohistoquímico.

1.5. HISTOPATOLOGÍA

El CCM se incluye entre los tumores de células pequeñas azules y se compone de nódulos dérmicos o subcutáneos de células pequeñas, monomorfas, redondeadas u ovaladas con núcleo vesiculoso y escaso citoplasma. Entre estos tumores de células pequeñas redondas y azules se incluyen el neuroblastoma, el rabdomiosarcoma, el tumor carcinoide metastásico, el tumor de célula pequeña y redonda desmoplásico, el melanoma amelanótico de célula pequeña, el condrosarcoma, el sarcoma de Ewing, el carcinoma microcítico de pulmón, el osteosarcoma y algunos linfomas. El principal diagnóstico diferencial histopatológico de CCM cutáneo es la metástasis cutánea del carcinoma microcítico de pulmón.

Subtipos histopatológicos.

En esta tumoración se han descrito diferentes patrones histológicos, que incluyen patrón trabecular, nodular y difuso, que no parecen tener implicaciones pronósticas. El patrón trabecular descrito por Toker en 1972 (1), es poco frecuente y suele estar limitado a la periferia de la lesión. Se caracteriza porque las células neoplásicas se distribuyen en trabéculas separadas por un estroma fibroso, y focalmente estas células se agrupan con formación de estructuras que recuerdan a glándulas y rosetas. El patrón más frecuente es el nodular, y se caracteriza porque las células se disponen formando nódulos sólidos. El aspecto general de este patrón nodular recuerda bastante al de un linfoma. El patrón difuso se caracteriza por un infiltrado de células pequeñas, en sábana, separadas por un estroma escaso (29).

La mayoría de los tumores mezclan varios subtipos histopatológicos en la misma lesión y esta subclasificación no tiene aplicación práctica. Las células pueden ser de mayor tamaño (sobre todo tras la radioterapia en recurrencias) y en algunos casos pueden presentar rasgos pleomórficos. El nucléolo suele ser múltiple, aunque no prominente. La necrosis puede ser muy evidente, con grandes áreas de necrosis en masa o presentarse como células necróticas individuales aisladas salpicando los agregados tumorales. Suelen presentar un alto índice mitótico y una elevada proliferación.

Las células de mayor tamaño, células pleomorfas o células claras se han asociado con mayor frecuencia a casos MCPyV negativos (32–35).

El mayor espesor tumoral (índice de Breslow), el alto índice mitótico, el crecimiento infiltrativo y la presencia de invasión linfática se han asociado con peor pronóstico y presencia de metástasis ganglionares (36).

Epidermotropismo

El epidermotropismo en el CCM fue descrito originalmente por el Rocamora et al. (37), y constituye un hallazgo que puede observarse en un 10-18% de los casos.

Carcinoma de Merkel intraepidérmico

En algunos casos se han descrito casos puramente intraepidérmicos, que se denominan CCM “in situ” o “baby Merkel tumor”. Estos casos se diagnostican habitualmente durante el seguimiento de pacientes con carcinomas basocelulares o epidermoides, aunque sólo existen 15 casos descritos en la literatura hasta la fecha. Cuatro de ellos consistían en CCM combinados con

carcinomas epidermoides in situ, dos de ellos combinados con queratosis seborreica y uno de ellos combinado con quiste tricolémico. Estos casos intraepidérmicos tienen mejor pronóstico, ya que no se han descrito recurrencias ni metástasis en estos pacientes. No existe un protocolo de manejo en estos casos. El diagnóstico diferencial histopatológico del CCM intraepidérmico incluye la enfermedad de Paget extramamaria, el carcinoma epidermoide pagetoide, el melanoma y otros tumores que tengan una extensión pagetoide intraepidérmica de las células neoplásicas (38).

Invasión linfática

En el estudio histopatológico del CCM se observan frecuentemente imágenes de invasión intralinfática, en muchas ocasiones cercanas a los márgenes quirúrgicos, que podrían explicar las metástasis o recurrencias locales, por lo que algunos autores recomiendan buscar específicamente este hallazgo y reflejarlo en el informe histopatológico. Asimismo, se recomienda realizar esta valoración con tinción D2-40 para resaltar los vasos con endotelio linfático, ya que en muchas ocasiones existe infiltración intralinfática y no se observa con claridad en la tinción con hematoxilina-eosina (39). Cuando se observa invasión intralinfática, estos CCMs presentan mayor riesgo de recurrencia local y metástasis, pero no existe relación con la supervivencia global (41).

CCMs combinados

Se trata de casos en los que el CCM se combina con otros tumores en la misma lesión. Es un hallazgo frecuente, sobre todo combinaciones con carcinoma epidermoide y enfermedad de Bowen. Una posible histogénesis de estos tumores combinados podría ser que ambos tumores deriven de la misma célula

madre multipotencial. Se han descrito también combinaciones con tumoraciones benignas, pero probablemente esto sea un hallazgo casual (40). Se ha descrito la relación entre la presencia de hiperqueratosis y ulceración con una mayor frecuencia de casos combinados y MCPyV negativos (41). Se ha descrito un caso de CCM y carcinoma epidermoide coexistiendo en el mismo ganglio linfático (40). En estos casos combinados, se expresan con mayor frecuencia PAX 5 y TTF1 (42). Estos casos combinados se diferencian del CCM clásico en que se diagnostican en estadios más precoces, tienen mayor riesgo de recurrencia y de mortalidad, muestran un menor infiltrado de CD8, son más frecuentemente positivos para TTF1 y p53, y habitualmente son negativos para MCPyV. Con técnicas moleculares se ha demostrado que la mitad de estos casos combinados fueron MCPyV positivo en el componente neuroendocrino y se postula que ambos tumores puedan seguir la misma vía oncogénica (43). Sin embargo, en otros estudios todos los casos combinados fueron negativos para MCPyV (44).

Neoangiogénesis

Existen muy pocos estudios de la vascularización del MCC. En un estudio realizado por Kazakov et al. (45) de 92 CCM, encontraron 18 casos (20%) con proliferación vascular y la clasificaron en cinco tipos: hiperplasia pericitaria, granuloma piogénico-like, hemangioendotelioma-like, hemangioma epitelioid-like y peliosis-like. En el estudio inmunohistoquímico no se demostró la presencia de HHV8 en estas proliferaciones vasculares.

En otro trabajo de Bob et al. (46), con una serie de 46 pacientes, se observó que la ulceración, la falta de epidermis y el sexo masculino eran factores pronósticos independientes de mal pronóstico.

Infiltrado inflamatorio

El CCM es un tumor susceptible a la inmunomodulación. Tiene, como hemos señalado, una incidencia mayor en pacientes inmunodeprimidos, el MCPyV es causante de una gran parte de estos tumores y pueden presentar mayor o menor grado de regresión. Todos estos datos sugieren una gran importancia del estroma tumoral inflamatorio y ya existen varios estudios publicados que relacionan la variabilidad de este estroma con mejores o peores supervivencias (47,48).

La presencia de linfocitos T CD8 positivos tanto en la periferia del tumor como intratumorales se ha relacionado con un mejor pronóstico y una mayor supervivencia libre de enfermedad.

El aumento de linfocitos T intratumorales se relaciona de forma independiente con la supervivencia. En un estudio realizado por Paulson et al. (47) con 137 pacientes, se dividieron los pacientes en cuatro grupos (sin infiltrado linfocitario, con infiltrado leve, moderado e intenso) y se observó que los pacientes que tenían una respuesta intensa CD8 intratumoral se relacionaban de forma directa con una mejor supervivencia (disminución de la mortalidad específica por CCM, misma tendencia con la supervivencia global, pero sin significación estadística). Por lo tanto, parece que la inmunidad citotóxica en estos pacientes desempeña un papel crucial en el pronóstico.

En otro estudio (49) con 20 casos de CCM en el que se analizó la distribución de las células inflamatorias peri e intratumorales (mediante estudio inmunohistoquímico con CD4, CD8, CD68, FOXP3, CXCR4, CXCR3 y CD20) se observó que estas células mostraban una distribución parcheada en la periferia

de los nódulos tumorales, y en algunos casos, su densidad era mayor en las áreas trabeculares. La mayoría de las células de la respuesta inflamatoria permanecían en la periferia tumoral y eran incapaces de penetrar en el espesor del parénquima tumoral.

En otro trabajo, publicado por Walsh et al. (48), se encontró una correlación significativa entre un intenso infiltrado linfocitario intratumoral y la presencia de MCPyV. Los linfocitos CD8+ predominaban en el infiltrado linfocitario y tenían predilección por la zona intratumoral. Los inhibidores de la respuesta inmune como los linfocitos T reguladores (FOXP3+) y los linfocitos “exhaustos” PD1 positivos estaban también presentes, pero en una proporción mucho menor. Los autores concluyeron que existe una relación directa entre el intenso infiltrado linfocitario, la positividad para MCPyV, el predominio de CD8+ en el infiltrado inflamatorio y la presencia de infiltrado inflamatorio inhibitor en menor medida.

En otro trabajo publicado por Feldenmeyer et al. (50), los autores también encontraron una relación directa entre la presencia de un infiltrado intenso en la periferia del tumor y una mayor supervivencia.

Se ha relacionado también la presencia de células mieloides CD33+ y CD8+ con un mejor pronóstico (51). Asimismo, un mayor número de células NK intratumorales en los CCMs que son MCPyV positivo se ha relacionado con un mejor pronóstico en una serie retrospectiva de 23 pacientes (52).

En un estudio retrospectivo realizado por Zaragoza et al. (53) encontraron una relación entre un ratio alto de neutrófilos/linfocitos en sangre con una peor supervivencia ligada al CCM.

Regresión

A pesar de ser el tumor cutáneo con mayor mortalidad, se han descrito una serie de casos de CCM que presentaban fenómenos de regresión total o parcial del tumor primario. Este fenómeno apoya también la importancia del estroma inmune en este tumor.

Se ha definido como regresión “la completa desaparición de un tumor clínicamente evidente durante todo el periodo de seguimiento”. Se estima que la incidencia de regresión en CCM es entre un 1,7% y un 3% (54).

Existen múltiples publicaciones de casos aislados de CCM que han regresado espontáneamente o tras una biopsia, tanto del tumor primario como de las metástasis ganglionares (55) y cutáneas (56). En total, existen menos de 40 casos publicados en la literatura con regresión hasta la fecha, y en solo 4 de ellos se realizó estudio de MCPyV, encontrándose que tres eran positivos y uno negativo, por lo que aún no se puede establecer con seguridad si existe o no una relación entre positividad de MCPyV y regresión. En los casos publicados existe un predominio del sexo femenino y la localización más frecuente del tumor fue la cabeza y el cuello (57).

Hasta la fecha, no se han definido criterios histopatológicos de regresión en CCM, en contraste con lo que sucede con la regresión de melanoma, de la que existen criterios bien establecidos.

En un estudio realizado en Japón por Inoue et al. (58) incluyeron la apoptosis, el índice proliferativo, la expresión de bcl2 y la expresión de p53 como criterios de regresión. También estudiaron el número de linfocitos presentes en el infiltrado.

De estos parámetros, sólo la apoptosis y el número de linfocitos resultaron ser significativamente mayores en el grupo de los CCM con regresión.

En contraposición con el melanoma, en el que la regresión parece asociarse con peor pronóstico, la regresión completa del CCM acaba en curación. En el melanoma se ha atribuido un peor pronóstico a efecto “Hammond”, que consiste en la asociación de niveles altos de competencia inmune en el paciente con tumores desdiferenciados y una mayor tendencia a la progresión.

La mayoría de los ejemplos de CCM con regresión, lo hacen tras la biopsia, por lo que una posible explicación es que la biopsia estimule una respuesta CD 8+ citotóxica que destruya por completo el tumor (59). No obstante, es preciso un estudio más detallado de este fenómeno.

Diagnóstico diferencial histopatológico

El diagnóstico diferencial histopatológico del CCM se debe realizar con otros tumores de células redondas y pequeñas, principalmente con metástasis cutánea de carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma epidermoide poco diferenciado, linfoma y melanoma de células pequeñas, entre otros.

1.6. MARCADORES TUMORALES Y DEL ESTROMA

El estudio inmunohistoquímico ayuda en el diagnóstico de CCM y es esencial para realizar el diagnóstico diferencial con sus simuladores.

Clásicamente se realizaban marcadores neuroendocrinos y epiteliales. Ahora contamos con un panel diagnóstico más específico. El tumor expresa de forma característica CK20, marcadores neuroendocrinos (cromogranina A,

sinaptofisina, CD56), neurofilamentos, SATB2 y de forma frecuente MCPyV. La tinción paranuclear en forma de glóbulo es característica de la positividad de CK20 (60). La CK20 presenta una tinción citoplasmática, paranuclear, en glóbulo, muy característica, denominada en inglés “dot-like”. Se ha descrito esta positividad paranuclear de CK20 como uno de los pilares principales para el diagnóstico (61), sin embargo su negatividad no descarta el diagnóstico de CCM.

Los CCM negativos para CK20 suelen ser también negativos para MCPyV. En un estudio se investigó la positividad o negatividad de MCPyV en 13 casos de CCM CK20 negativo y 10 de esos 13 casos fueron también negativos para MCPyV (61). Se ha descrito también un caso de CCM negativo para CK20 y CK7. Un 10-15% pueden ser negativos para CK20, pero habitualmente estos casos son positivos para CK7 (62).

Recientemente se ha descrito la proteína asociada a insulinoma (INSM1) como un marcador específico de CCM (63).

Los marcadores más utilizados para el estudio de los tumores de “células azules y pequeñas” se expresan con detalle en la siguiente tabla (60):

Inmunohistoquímica	CCM	Simuladores
CK20	+	-
Marcadores neuroendocrinos (cromogranina A, sinaptofisina, CD56)	+	+/-
INSM1	+	+/-
NF	+	-
SATB2	+	-
MCPyV	+ (frecuentemente)	-
AE1/AE3	+	+/-
Sox10	-	+ (melanoma)
LCA (CD 45)	-	+ (linfoma)

CK7	-	+ (pulmón y otros)
TTF-1	-	+ (pulmón, tiroides)
Napsina	-	+ (pulmón)
CDX2	-	+ (gastrointestinal)
Pax 8	-	+ (cáncer pancreático)
Calcitonina	-	+ (carcinoma medular de tiroides)
GATA 3	-	+ (cáncer de mama)

Tabla 1. Diferencias inmunohistoquímicas entre CCM y otros tumores de células azules pequeñas.

Existen otra serie de marcadores que no se utilizan de rutina para el estudio de CCM, pero que se analizarán en el presente estudio y se detallan a continuación sus definiciones y su utilidad en tumores cutáneos.

Marcadores linfocitarios: CD3 (marcador de célula T), CD8 (marcador de linfocito citotóxico), CD4 (marcador de linfocito colaborador), PAX5 (proteína activadora de célula B), CD20 (marcador de linfocito B), ROR gamma T. Con la excepción de PAX5, estos marcadores son negativos en el tumor, restringidos al microambiente tumoral.transcripción de linfocito Th17).

PD1/PDL1:

PD1 es una proteína transmembrana, que pertenece a la familia B7/B28. Se expresa típicamente en los linfocitos B y T activos, células dendríticas y monocitos.

PDL1 está más ampliamente expresada y se ha detectado en monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T reguladoras y en algunas líneas celulares de tumores murinos.

La interacción entre PD1 y PDL1 reduce la proliferación y la función efectora, disminuye la secreción de citoquinas e inhibe las proteínas de supervivencia en la célula que expresa PD1. Como resultado, se induce la apoptosis, se inhibe la activación de los linfocitos T y se reduce la atracción de más células inmunes.

En la interacción de las células tumorales con las células del huésped hay 3 fases esenciales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de escape tumoral se dan varios mecanismos, como inhibición del reconocimiento tumoral o modificación del microambiente tumoral secretando diversas citoquinas. Muchos tumores sólidos y algunas neoplasias linfocitarias expresan PDL1. Se ha descrito que las células positivas para PDL1 pueden inducir apoptosis en las células PD1 positivas y en los linfocitos que infiltran el tumor (TILs).

Estos dos marcadores han adquirido creciente interés con la aparición de las terapias dirigidas anti PD1 y anti PDL1.

De acuerdo con el trabajo de Mitteldorf et al. (64), los CCM expresan de forma infrecuente PD1 y la expresión de PDL1 depende de MCPyV. Cuando lo hace, el PDL1 se expresa en la periferia del tumor.

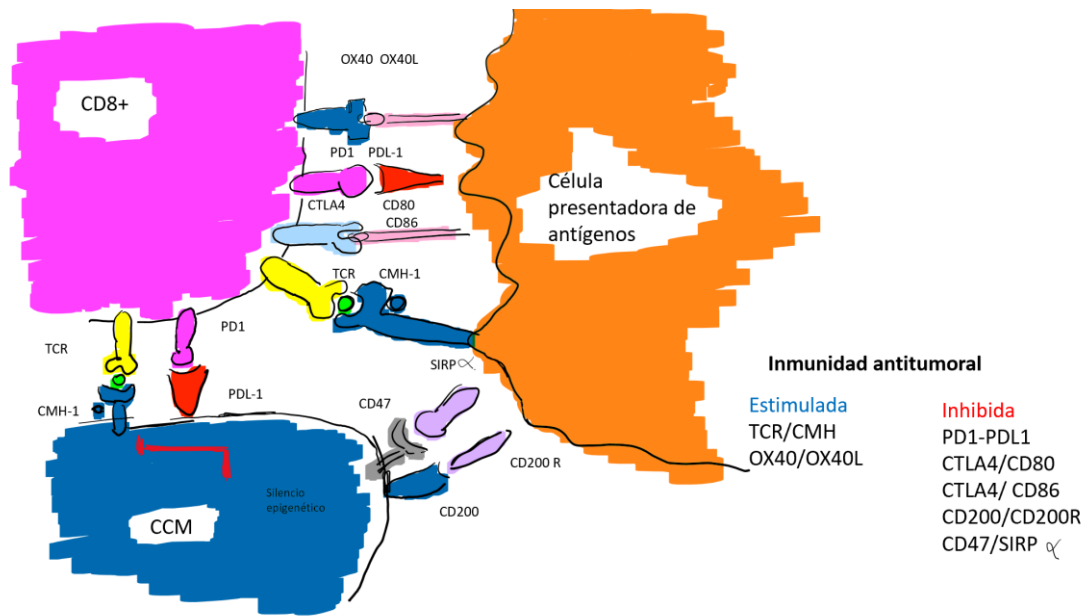


Fig. 4. Interacción de las células tumorales con las células CD8 + y las células presentadoras de antígenos.

FOXP3

FOXP3 es un marcador de célula T reguladora, que actúa suprimiendo la respuesta inmune. Se considera que estas células son un subgrupo de linfocitos CD4+, aunque también hay células FOXP3 CD8+. Ambas células se han identificado en el microambiente tumoral del CCM. Suele existir escaso número de células y FOXP3+ cuando están presentes lo hacen en la periferia del tumor, pero parece ser que estas células pueden ser antagonistas de la inmunidad tumoral. Existen sólo tres trabajos publicados en los que se estudian estas células T reguladoras que se expresan en menor medida que las CD8+.

PAX 5

La proteína activadora de célula B (PAX 5) es un factor de transcripción nuclear que tiene un papel fundamental en la diferenciación y proliferación de los linfocitos B. La expresión de PAX 5 aumenta durante la maduración de los

linfocitos B, pero está ausente en las células plasmáticas y células T. PAX 5 se expresa en la inmensa mayoría de las neoplasias de células B. Además, PAX 5 es positivo en tumores epiteliales y mesenquimales, incluyendo tumores poco diferenciados como el CCM, el neuroblastoma, los carcinomas escamosos de la cavidad oral, el tumor de Wilms y el rabdomiosarcoma.

Esta positividad de PAX 5 en CCM ha llevado a algunos autores a postular que el origen de esta neoplasia sea una potencial célula pre-B. PAX 5 es positivo entre un 30% y 70% de los CCM según los distintos estudios y no se asocia con significación estadística a la expresión de MCPyV (65).

ROR gamma-T

El factor de transcripción ROR gamma T dirige la diferenciación de las células Th17, que secretan la interleuquina 17 y participan en la inmunidad protectora y patológica. No hay trabajos publicados previamente sobre CCM y ROR gamma T.

Marcadores histiocitarios:

CD163 y CD68. Sihto y colaboradores (66) estudiaron la composición de este infiltrado y encontraron mayor presencia de CD163 y CD68 en los CCM MCPyV positivos. Su expresión está restringida al microambiente tumoral.

Marcadores de apoptosis y citotóxicos:

Caspasa 3 activa

Es un marcador de apoptosis. No hay estudios publicados sobre caspasa 3 activa en CCM.

TIA 1

El producto codificado por este gen es un miembro de una familia de proteínas de unión a ARN y posee actividad nucleolítica contra células diana de linfocitos citotóxicos (CTL). Se ha sugerido que esta proteína puede estar involucrada en la inducción de la apoptosis, ya que reconoce de manera preferente los homopolímeros poli (A) e induce la fragmentación del ADN en objetivos CTL. La principal especie asociada a los gránulos es una proteína de 15 kDa que se cree que deriva del término carboxilo del producto de 40 kDa por procesamiento proteolítico. Se ha encontrado un empalme alternativo que resulta en diferentes isoformas de este gen.

Granzima y perforina

Son marcadores de linfocitos T citotóxicos (49) . Aún no estudiados en CCM.

Otros marcadores:

H3K27me3:

En los últimos años se ha demostrado que cambios epigenéticos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. El “polycomb repressiv complex 2” (PCR 2) es uno de los principales reguladores epigenéticos que cataliza la trimetilación de la lisina (K)27 a histona H3. (H3K27me3). La reducción en la expresión de H3K27me3 se asocia con un fenotipo puro (no combinado) de CCM (67).

ALK (“Anaplastic Lymphoma Kinase”)

La ALK es un receptor tirosín-quinasa que tiene tres dominios: intracelular, transmembrana y extracelular.

Durante la vida prenatal, ALK se expresa en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico y durante la vida postnatal se expresa en células gliales, células endoteliales y pericitos. Se postula que tiene un papel crucial en la diferenciación neuronal y en la mitogénesis.

La expresión desregulada de ALK tiene efectos tumorigénicos *in vitro* e *in vivo* (68), activando la sobreexpresión de ALK activa las vías Ras-ERK (proliferación celular), JAK3-STAT3 (aumentar la supervivencia celular) y PI3K-Akt (aumentar supervivencia celular).

ALK se considera un marcador “promiscuo” y contribuye al desarrollo de tumores de diferentes estirpes (68), incluyendo neoplasias hemato-linfoides (linfoma anaplásico de células grandes, histiocitosis), mesenquimales (tumor miofibroblástico, rabdomiosarcoma), tumores epiteliales (adenocarcinoma de pulmón, carcinoma renal, carcinomas de ovario) y tumores neurales (glioblastoma, neuroblastoma). A través de fusiones génicas, mutaciones activadoras y amplificación génica tiene efectos tumorigénicos.

En cuanto a la piel, se han descrito múltiples tumores positivos para ALK (linfoma anaplásico de células grandes, dermatofibroma epitelioides, melanoma, carcinoma basocelular, CCM) (68–71) .

Tumor	Mutación de ALK	Clínica	Histología
Melanoma	Translocation /isoforma ALK ^{ATL}	Melanoma acral/ Melanoma nodular	No presenta histología específica/células malignas amelanóticas epitelioides o fusiformes y epitelioides
Tumores spitzoides	Translocaciones con TPM3, NPM1, CLIP1, TPR, GTF3C2, DCTn1	Lesiones amelanóticas o de aspecto vascular de predominio en extremidades inferiores	Melanocitos distribuidos con crecimiento fascicular y radial, predominantemente amelanóticos
Dermatofibroma epiteliode	Translocación de VCL y SQSTM1	Nódulo solitario simétrico en extremidades	Patrón estoriforme con células fusiformes e histiocitos con una población abundante de células epitelioides
Carcinoma de células de Merkel	Desconocidas	Nódulo rojizo-violáceo	No presenta histología específica
Carcinoma basocelular	Desconocidas	Pápula o placa perlada con telangiectasias superficiales	No presenta histología específica

Tabla 2. Tumores cutáneos ALK positivos (72).

Existen tres trabajos publicados hasta la fecha, que muestran positividad de ALK en CCM.

En el primero (73) se describieron 32 casos de CCM y 12 carcinomas microcíticos de pulmón y realizaron la tinción de ALK mediante inmunohistoquímica con los anticuerpos D5F3, ALK 1 y 5A 4. De los CCM, un 92% eran positivos para ALK, frente a un 8% de positividad en los tumores microcíticos pulmonares. Además realizaron FISH en 10 casos de CCM y no

encontraron reordenamientos en ninguno de ellos. El segundo (74) describió la positividad para ALK y EZH2 y el último (75), recientemente publicado, con 112 CCM de los cuales un 51% presentaban una positividad intensa para ALK y esta positividad se relacionó con la presencia de MCPyV.

HLA1 y HLA2

Antígenos de histocompatibilidad, esenciales en la visibilidad de las células neoplásicas por el sistema inmune.

1.7. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO Y MOLECULAR

La secuenciación de nueva generación ha facilitado la comprensión del perfil molecular de los carcinomas de células de Merkel y permiten clasificarlos en dos grupos, dependiendo de la carga mutacional tumoral.

Los tumores con alta carga mutacional son los que presentan mutaciones debidas a la radiación ultravioleta: mutaciones en p53, gen de Rb y ausencia de MCPyV. En cambio, los tumores con baja carga mutacional son los que son positivos para MCPyV y no tienen mutaciones (76,77).

1.8. ESTADIFICACIÓN

Para la realización de este trabajo tomaremos como referencia la octava edición de la clasificación de la AJCC para el carcinoma de células de Merkel (78).

T

TX Tumor primario no puede ser determinado (tras curetaje)

T0 Sin evidencia de tumor primario

Tis Tumor primario in situ

T1 Diámetro mayor del tumor ≤ 2 cm

T2 Diámetro mayor del tumor > 2 cm y ≤ 5 cm

T3 Diámetro mayor del tumor > 5 cm

T4 Tumor primario invade la fascia, el músculo, el cartílago o el hueso

N

NX Afectación ganglionar no puede determinarse

N0 Ausencia de afectación ganglionar clínica/radiológica

pN0 (ausencia de afectación ganglionar histopatológica)

N1 Metástasis ganglionares regionales

pN1 (confirmadas histopatológicamente)

pN1a (clínicamente ocultas, detectadas por disección ganglionar)

pN1a (sn) (clínicamente ocultas, detectadas por biopsia selectiva de ganglio centinela)

pN1b (clínica o radiológicamente detectadas y confirmadas histopatológicamente)

N2 Metástasis en tránsito sin metástasis ganglionares

pN2 (metástasis en tránsito confirmadas histopatológicamente sin metástasis ganglionares)

N3 Metástasis en tránsito con metástasis ganglionares regionales

pN3 (metástasis en tránsito con metástasis ganglionares regionales confirmadas histopatológicamente)

M

M0 Ausencia de metástasis a distancia clínicas/radiológicas

M1 M1a (metástasis cutáneas o subcutáneas a distancia o metástasis ganglionares a distancia no regionales)

M1b (metástasis pulmonares)

M1c (metástasis en otras vísceras)

Estadíaaje según AJCC 8ª edición:

Tis N0 M0	Estadio 0
T1 N0 M0	Estadio I
T2-3 N0 M0	Estadio IIA
T4 N0 M0	Estadio IIB
T1-4 N1a (sn) o N1a M0	Estadio IIIA
T0 N1b M0	Estadio IIIB
T1-T4 N1b-N3 M0	Estadio IIIC
T0-4 N0-N3 M1	Estadio IV

1.9. FACTORES PRONÓSTICOS

Existen múltiples factores pronósticos en el CCM. Algunos de ellos los hemos ido comentando en apartados previos.

El estadio clínico comentado en el apartado previo es el mayor determinante del pronóstico.

a. Características del paciente.

El sexo masculino, la edad avanzada y la inmunodepresión se han descrito como factores de mal pronóstico en pacientes con CCM. Los pacientes inmunodeprimidos tienen peores supervivencias, particularmente los que

presentan leucemia linfocítica crónica o han recibido un trasplante de órgano sólido.

La radiación ultravioleta es un factor determinante para el desarrollo de mutaciones y es el agente causal de los CCM MCPyV negativos.

También se ha descrito como factor de mal pronóstico la localización del tumor primario en cabeza y cuello (79).

b. Virus

Relación de MCPyV con el pronóstico

Los trabajos publicados hasta la fecha con respecto al pronóstico y la presencia de MCPyV sugieren un peor pronóstico en los casos negativos para el virus, con la única excepción del estudio de 2011 de Schrama et al. (32) que no encontraron un peor pronóstico en los CCM MCPyV negativos.

Estudio	Casos	Pronóstico
Sihto et al. (80) 2009	114 casos	Peor pronóstico en MCPyV negativos
Nardi et al. (81) 2012	60 casos	Peor pronóstico para los casos MCPyV negativos
Schrama et al. (82) 2011	127 pacientes	No diferencias en el pronóstico
Moshiri et al. (26) 2017	282 pacientes	Peor pronóstico en casos MCPyV negativos. Serie más amplia

Tabla 3: Trabajos publicados con respecto al pronóstico según la presencia o ausencia de MCPyV.

c. Estado inmune/infiltrado inflamatorio

Un número elevado de células CD8+ intratumorales es un marcador específico relacionado con una mayor supervivencia. También, la presencia de linfocitos en la periferia implica un mejor pronóstico (47,66).

d. Características histopatológicas

Algunos estudios han relacionado el índice de Breslow, la infiltración vascular, el patrón de crecimiento, el número elevado de mastocitos o la densidad vascular como factores de mal pronóstico (36,83,84).

La invasión linfo-vascular se ha relacionado con aumento de recidivas y de metástasis, al igual que un número elevado de figuras mitóticas (85).

Los pacientes que presentan CCM ganglionar sin afectación cutánea presentan el doble de supervivencia con respecto a los que tienen mismo estadiaje con lesión primaria cutánea. Los pacientes que tienen CCM de origen desconocido y no están inmunodeprimidos, tienen títulos altos de oncoproteínas y alta carga mutacional. La piel de estos pacientes tiene abundantes mutaciones dependientes de la radiación ultravioleta (30).

e. Otros

La expresión de p63 por parte de las células tumorales se ha relacionado con un peor pronóstico. Una revisión sistemática reciente que analiza la evidencia hasta la fecha de p63 lo relaciona con un peor pronóstico y lo relaciona con los casos MCPyV negativos (85).

Finalmente, existen otras muchas publicaciones que describen diversos marcadores relacionados con el pronóstico del CCM, pero los factores que hemos nombrado en los apartados anteriores son los más importantes.

1.10. TRATAMIENTO (86)

a. Cirugía:

La cirugía es el tratamiento de elección en CCM. Según la NCCN se recomienda un margen entre 1 y 2 cm y profundizar hasta la fascia o periostio (nivel III de evidencia). Algunos estudios han sugerido que márgenes amplios entre 2 y 3 cm disminuyen el riesgo de recurrencia local. Los márgenes quirúrgicos tienen que ser valorados en función de la morbilidad de la cirugía. La recurrencia local tras cirugía varía entre el 25% y el 40%.

No existen estudios hasta la fecha que demuestren superioridad de la cirugía de Mohs frente a una cirugía convencional con márgenes de seguridad en el tratamiento del CCM.

Si se realiza ganglio centinela debe hacerse antes de la ampliación o cirugía de Mohs para no alterar el drenaje linfático de la zona. Si el paciente no es candidato a cirugía, la radioterapia local es una buena opción.

Se podría resumir de la siguiente forma:

¿El paciente es candidato a cirugía?

No → Radioterapia

Sí → extirpación quirúrgica y ganglio centinela.

a) bajo riesgo del tumor y del paciente. Radioterapia adyuvante vs observación*.

(*en muy raras ocasiones se recomienda observación. El paciente y el tumor tienen que cumplir muchos criterios de buen pronóstico, que habitualmente no cumplen).

b) alto riesgo del tumor o del paciente. Radioterapia adyuvante.

b. Radioterapia:

El CCM es un tumor radiosensible. En una revisión sistemática publicada en el año 2018 (87) se observó que la radioterapia precoz previene las recurrencias locorregionales, pero no es capaz de prevenir las metástasis a distancia.

En un estudio en prensa de 2020, Tarabadkar y cols. (88) analizan 188 casos de enfermedad localizada y proponen una radioterapia precoz como factor de buen pronóstico y de “ahorro” de márgenes quirúrgicos.

En este estudio comparan una serie de casos en los que se realiza una cirugía “conservadora” (márgenes menores de 1 cm), pero en los que se administra radioterapia precoz, y estos casos tienen una supervivencia similar y recurrencias similares a los casos en los que se realizan cirugías más amplias; y una supervivencia y recurrencias mejores que en los que no se administra radioterapia.

c. Quimioterapia:

La quimioterapia convencional en el CCM no ha conseguido aumentar la supervivencia. En los estadios metastásicos, la respuesta a la quimioterapia no es duradera y aparecen numerosos efectos adversos.

Los regímenes que se han administrado con mayor frecuencia incluyen carboplatino (o cisplatino) y etopósido o combinación de ciclofosfamida, doxorubicina (o epirubicina) y vincristina.

Las respuestas iniciales varían entre un 53% y un 76%, pero habitualmente estas respuestas no son mantenidas (89).

Un estudio retrospectivo en 6.908 pacientes demostró que la quimioterapia no aumentaba la supervivencia en pacientes con enfermedad local o avanzada (90), por lo que la quimioterapia clásica ha sido reemplazada en los últimos 5 años por la inmunoterapia.

d. Inmunoterapia:

Se ha sugerido que en los pacientes con CCM puede ser efectiva la inmunoterapia. La regresión espontánea es un fenómeno infrecuente, pero bien documentado, y probablemente se debe a la activación del sistema inmune. Los pacientes con mayor infiltrado T tienen mejor pronóstico que los que no tienen infiltración linfocitaria. Además, el CCM se presenta con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos y éstos tienen peor pronóstico. Finalmente, los CCM positivos para MCPyV o con expresión incrementada de neoantígenos asociados con mutaciones inducidas por la radiación ultravioleta puede constituir dianas específicas antitumorales.

Tanto el sistema inmune innato como adaptativo puede tener efectos antitumorales. El sistema inmune adaptativo está mediado por la activación de células T efectoras, por las células presentadoras de antígenos y está modulado

por proteínas que se expresan tanto en las células tumorales como en las células del sistema inmune.

La activación del sistema inmune puede realizarse por múltiples vías activadoras, como TCR/MHC y OX40/OX40L; o inhibidoras como PD1-PDL1, CTLA4/CD80, CTLA4/CD86, CD200/CD200R. Estas vías inhibidoras del sistema inmune pueden ser utilizadas por el tumor para escapar de este sistema.

Avelumab: Es el único fármaco aprobado por la FDA para el CCM metastásico. Varios ensayos clínicos han demostrado su eficacia (91–94).

Pembrolizumab: Un estudio con 26 pacientes demostró una respuesta completa en el 15% de los pacientes y parcial hasta en el 56% de los pacientes. El ensayo clínico publicado por Nhiegm et al. (95) en 2016 representó un antes y un después en el tratamiento de estos pacientes.

Nivolumab: Es un anticuerpo humanizado IgG4 anti PD-1. Se han descrito casos metastásicos con respuesta a este fármaco (96).

Sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes con CCM metastásico no responden a la inmunoterapia (24). Este hecho, junto con los efectos adversos de la medicación y la contraindicación en pacientes con trasplante de órgano sólido y con enfermedades autoinmunes hacen que aún nos queda mucho camino por recorrer en este sentido.

Por otra parte, a diferencia del melanoma, en el que la cuantificación de PD-L1 con inmunohistoquímica predice la respuesta a inmunoterapia, no se ha observado esta correlación en el CCM. En la actualidad existen investigaciones

en curso tratando de encontrar nuevos biomarcadores predictores de esta respuesta (97).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS DE ESTE ESTUDIO

- El CCM es un tumor heterogéneo, donde la presencia del MCPyV se asocia con cambios distintivos tanto en las células tumorales como en el ambiente del tumor.
- La densidad del infiltrado inflamatorio y el fenotipo de los linfocitos y macrófagos intratumorales pueden ser utilizados como factor pronóstico.

3. OBJETIVOS

1. Analizar las características clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas de una serie retrospectiva y multicéntrica de 219 pacientes con carcinoma de células de Merkel (CCM), para tratar de identificar marcadores característicos, variabilidad intratumoral y heterogeneidad, analizando asimismo la relevancia clínica de esos hallazgos.
2. Diferenciar las características clínicas, histopatológicas, inmunohistoquímicas y moleculares (en casos seleccionados) de los tumores poliomavirus (MCPyV) positivo y negativos.
3. Relacionar la presencia de MCPyV con variaciones en los marcadores propios del tumor y del estroma y también con el curso clínico del CCM.
4. Definir criterios de regresión histológica en CCM y correlacionar la presencia de regresión con el resto de marcadores inmunohistoquímicos y pronósticos.
5. Relacionar la presencia de marcadores específicos en el tumor y en el estroma con la supervivencia global y ligada al tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo y multicéntrico que incluye casos de hospitales de Madrid, Valencia, Vigo, Toledo, La Coruña, Santander y Friedrichshafen (Alemania). En este estudio se han incluido 219 casos con diagnóstico confirmado histopatológicamente de carcinoma de células de Merkel, diagnosticados en estos hospitales entre los años 1995 y 2018.

Procedencia de los casos:

Debido a la baja frecuencia del tumor, para poder estudiar un número amplio de casos se realizó un estudio multicéntrico. La proporción de la procedencia de los casos aparece reflejada en el siguiente gráfico. Entre paréntesis se especifica el número de casos recibidos de cada centro:

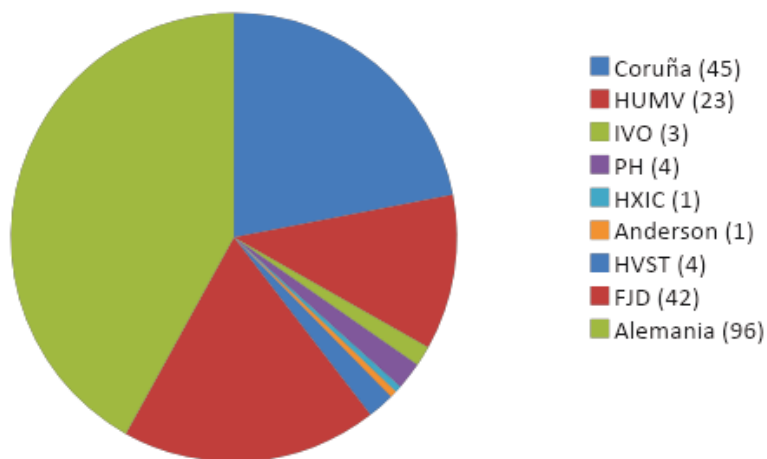


Fig. 5. Procedencia de los casos estudiados.

Los casos proceden de todos los hospitales detallados en el gráfico y se recibió el siguiente material:

1. FJD y asociados: se reciben bloques de parafina de la Fundación Jiménez Díaz y de hospitales del grupo (Hospital Rey Juan Carlos, Hospital Infanta Elena, Hospital General de Villalba).
2. La Coruña: se reciben bloques en parafina de los casos del Hospital Juan Canalejo de La Coruña.
3. Otros hospitales: Desde Santander se recibe sólo un TMA con casos procedentes de HUMV (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla), IVO (Instituto Valenciano de Oncología), PH (Hospital Puerta de Hierro) , HXIC (Hospital Xeneral Islas Cíes), Anderson (Clínica Anderson) , HVST (Hospital Virgen de la Salud de Toledo).
4. Friedrichshafen (Alemania): se reciben bloques de parafina del Dermatohistopathology Laboratory de Friedrichshafen (Alemania).

1. Clínica:

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes recogiendo en cada caso los siguientes datos:**

***En los casos procedentes del Dermatopathology Laboratory de Friedrichshafen (Alemania) los únicos datos clínicos que pudieron obtenerse fueron el sexo, la edad del paciente, la localización de la lesión y la fecha de diagnóstico.*

Sexo: Mujer-Varón

Edad: medida en años

Localización: Se recogió el sitio exacto donde asentaban la/las lesión/lesiones primaria/primarias. Se dividió la superficie corporal en cabeza y cuello, tronco, miembros inferiores, miembros superiores y ganglios linfáticos.



Fig. 6. Ejemplo de CCM en su localización más frecuente en cabeza de una mujer anciana, sobre una piel con daño actínico crónico.

Fecha de diagnóstico: Se recogió el día, mes y año de la fecha del primer procedimiento quirúrgico que dio lugar a una biopsia o una extirpación.

Inmunosupresión: Se analizaron diversas condiciones del paciente asociadas a una depresión del sistema inmunitario. Si/No. En caso afirmativo se especificó el tipo de inmunosupresión:

VIH, trasplantados (especificando el tipo de trasplante), leucemia linfocítica crónica, neoplasias malignas sólidas (especificando el tipo de neoplasia), fármacos que estuviese tomado el paciente en el momento del diagnóstico.

Estadio: Según la clasificación de la AJCC de 2018, dividimos el estadiaje de cada paciente en estadios de I a IV. Para un análisis posterior más sencillo no subdividimos cada uno de estos estadios.

Cirugía: Se analizó si se llevó a cabo extirpación quirúrgica de la lesión primaria.

Si/No

Radioterapia: Se consignó si el paciente había recibido o no radioterapia. Si /No

Quimioterapia: Se revisó en la historia clínica si el paciente había recibido o no quimioterapia. Si /No. En caso afirmativo, se especificó la pauta de quimioterapia administrada.

Metástasis o recidiva: Se recogió si el paciente había presentado metástasis o recidiva. Si/No. En caso afirmativo, se especificó la fecha de diagnóstico de la misma consignando día, mes y año.

Supervivencia global: Se contabilizó en meses el periodo de tiempo desde el diagnóstico hasta la fecha de muerte (independientemente de la causa)

Supervivencia libre de enfermedad: Se contabilizó en meses el periodo de tiempo desde el diagnóstico hasta la primera recidiva.

Supervivencia ligada al tumor: Se consignó si el paciente falleció o no por causa del tumor o por complicaciones derivadas del mismo.

2. Histopatología:

Todos los casos fueron revisados por tres dermatopatólogos expertos (*Dres. Requena, Piris y Santonja*) y una dermatóloga (*Dra. Mendoza*) para confirmar el diagnóstico y la validez de la muestra (en relación a la presencia de tejido suficiente en el bloque para nuestras investigaciones). Para el estudio histopatológico, se analizaron un mínimo de 4 secciones de 5µm teñidas con

H-E de cada caso. Se descartaron 14 casos por diagnóstico erróneo o tejido insuficiente o deteriorado.

En cada caso, se analizaron las siguientes variables histopatológicas:

Patrón de crecimiento: Clasificamos el patrón de crecimiento del tumor en nodular, trabecular o mixto (este último patrón se estableció cuando existía mezcla de los patrones anteriores en la misma lesión).



Fig. 7. Patrón nodular.

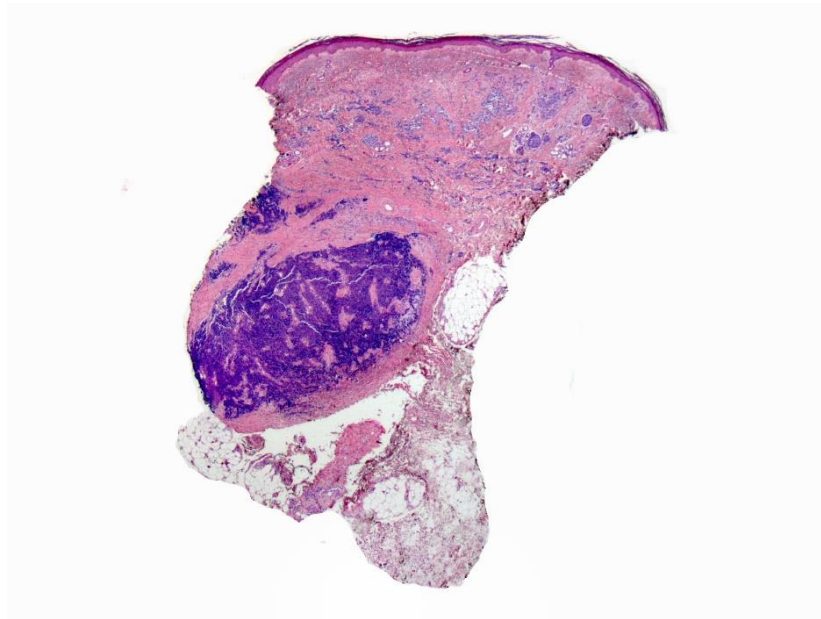


Fig. 8. Patrón mixto: Trabecular en las áreas superficiales y nodular en las profundas.

Profundidad: Infiltración en profundidad del tumor determinada por la célula neoplásica más profunda del tumor, clasificándola en dérmica, hipodérmica o con infiltración del músculo esquelético subyacente.

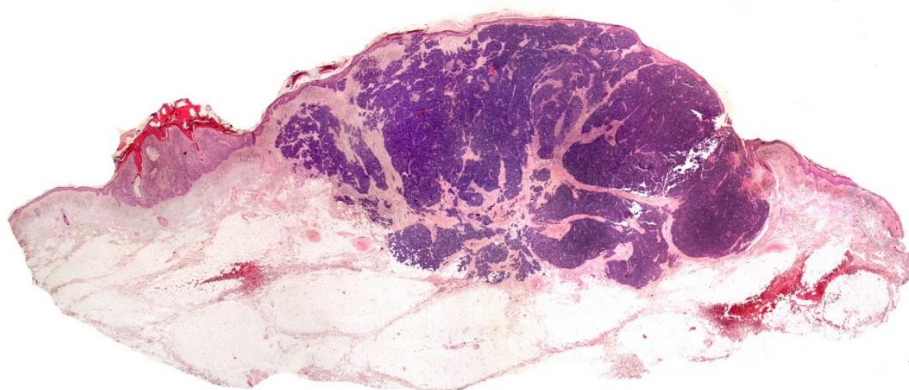


Fig. 9. En este caso el tumor infiltraba hasta el límite dermo-hipodérmico.

Clásicos/combinados: Se clasificaron como CCM clásicos, aquellos casos en los que no existía combinación con otros tumores en la misma lesión. Se consideraron como CCM combinados, aquellos casos que mostraban un CCM en colisión o entremezclado con otra neoplasia, epitelial o no epitelial, en la misma lesión. Analizamos la variante “combinados” como Sí/No y, en caso afirmativo, especificamos el otro tipo de tumor asociado a CCM.

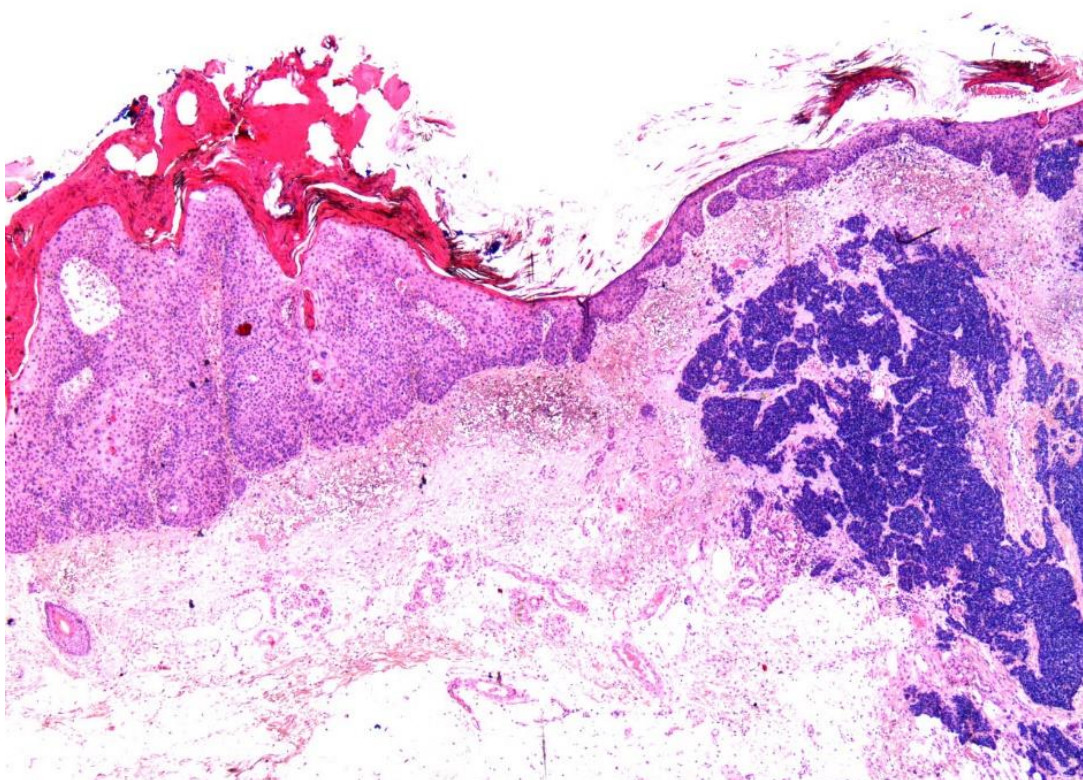


Fig. 10. CCM en colisión con carcinoma epidermoide in situ.

Presencia de necrosis: Presencia o ausencia de necrosis. Si/No.

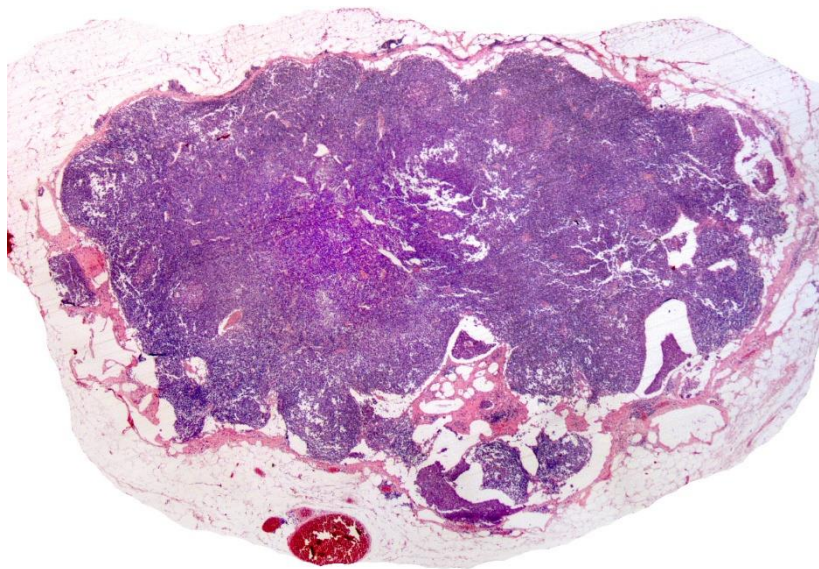


Fig. 11. CCM con áreas de necrosis en masa.

Ulceración: Presencia o ausencia de ulceración. Solución de continuidad en la superficie del tumor. Sí/No

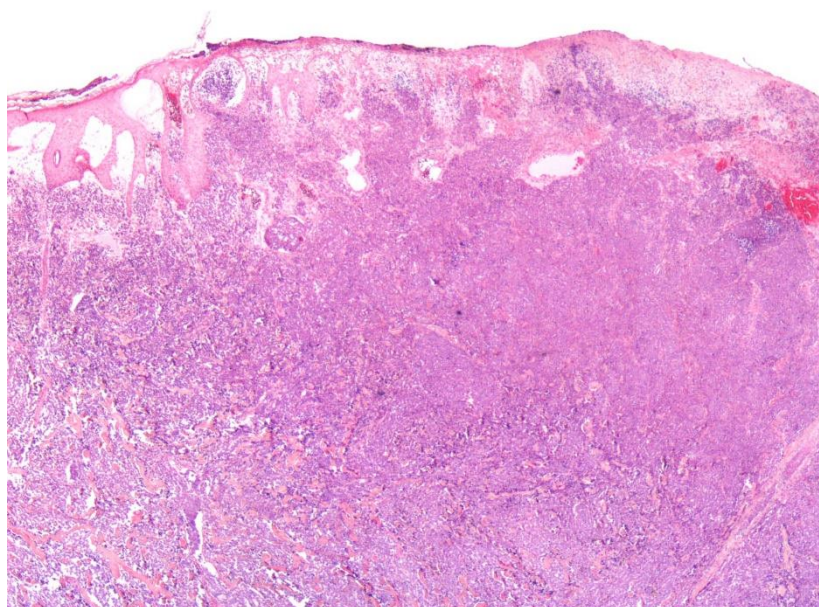


Fig. 12. Ulceración. Solución de continuidad en la superficie del tumor.

Epidermotropismo/Anexotropismo/Neurotropismo: Se analizó la presencia de células neoplásicas de CCM en el interior del epitelio epidérmico, de los anejos cutáneos y alrededor de los fascículos nerviosos dérmicos, valorando esta variable como Sí/No.

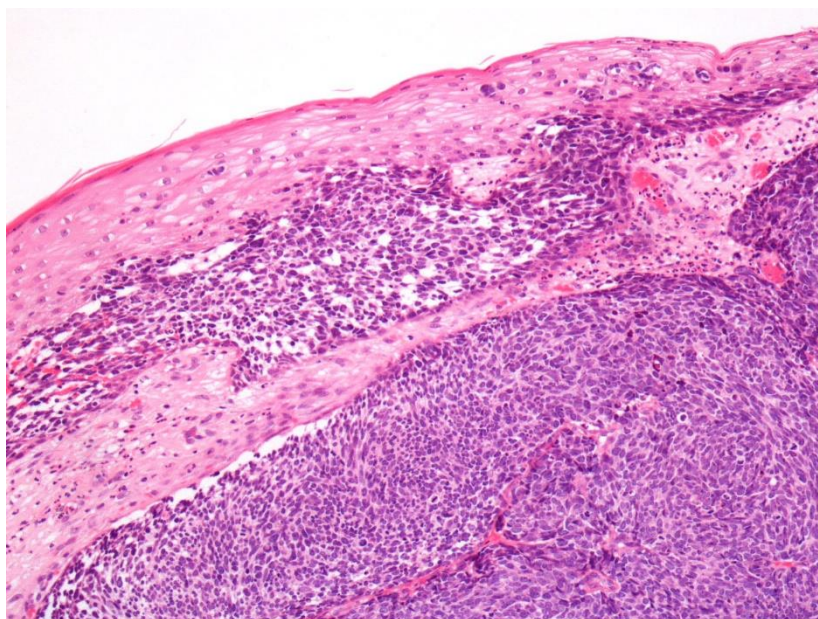


Fig. 13. Caso de CCM con epidermotropismo.

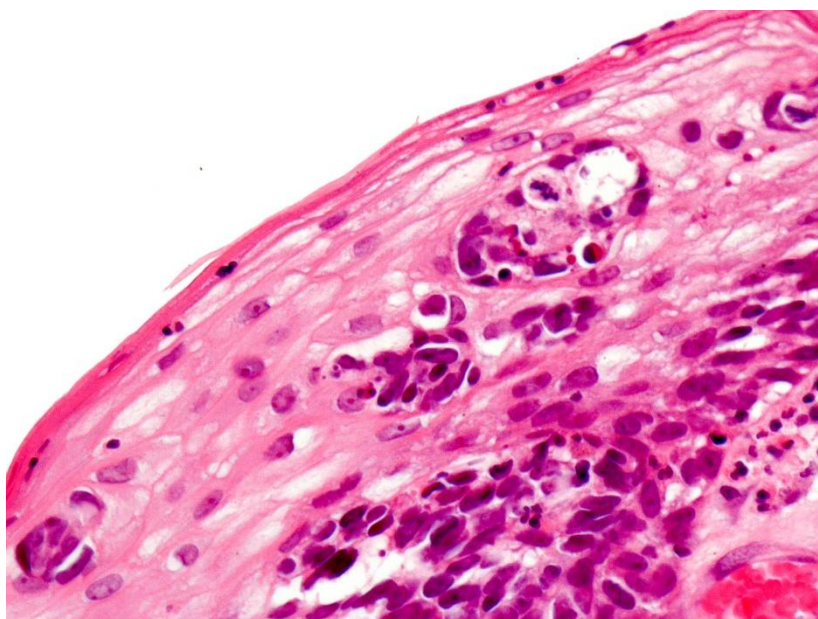


Fig. 14. Presencia de células de CCM dentro del epitelio epidérmico.

Invasión linfo-vascular: Se analizó la presencia de células tumorales en el interior de la luz de vasos sanguíneos y/o linfáticos, valorando esta variable como Sí/No. No se realizaron estudios inmunohistoquímicos con D2-40 u otros marcadores de endotelio linfático, por lo que la distinción entre vaso sanguíneo o linfático se estableció en base a las características histológicas de la pared vascular y de las células endoteliales teñidas con H-E, y se consideró como vasos linfáticos aquellos vasos de pared muy fina con endotelio discontinuo y el resto de los vasos como sanguíneos.

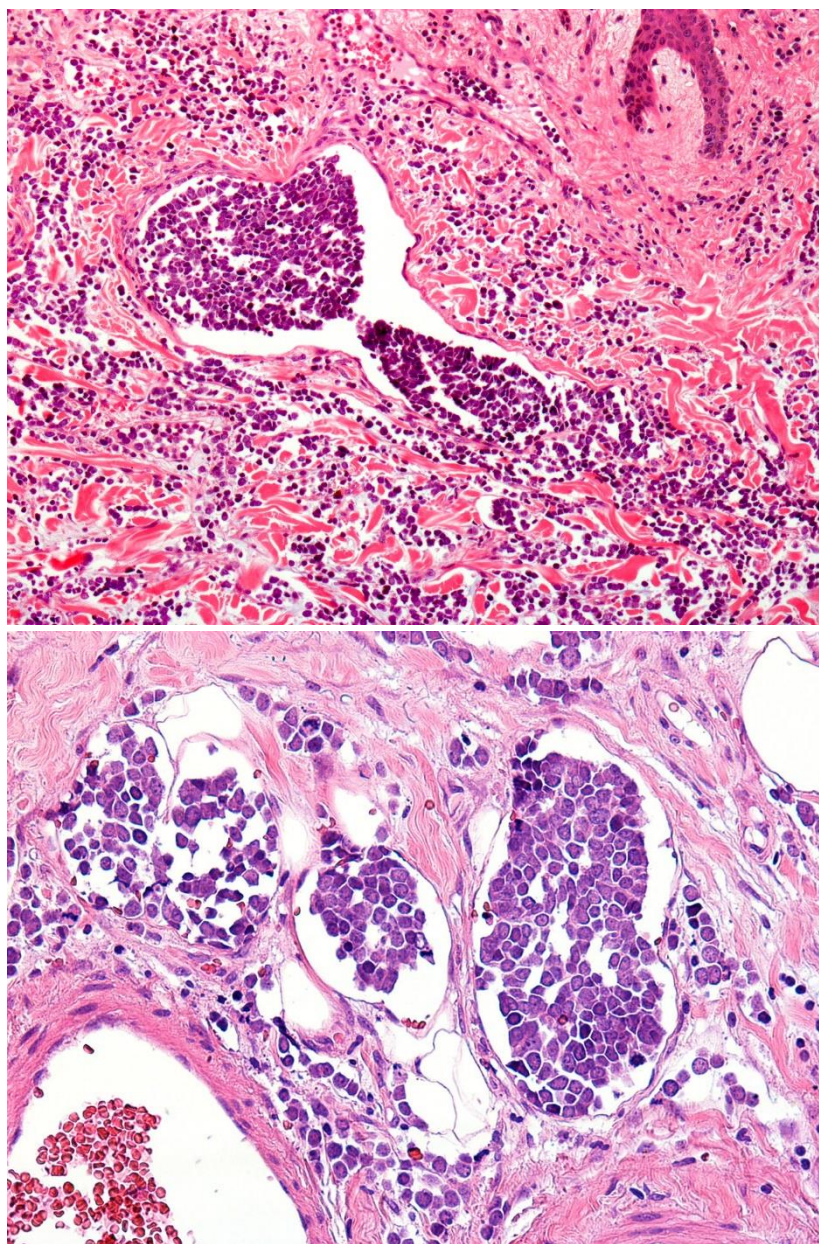


Fig. 15. Invasión linfovascular: Presencia de células tumorales en el interior de la luz de los vasos sanguíneos o linfáticos.

Neoangiogénesis: Se analizó la presencia de vasos sanguíneos de naturaleza capilar en la periferia del tumor o en el estroma entre los agregados de células neoplásicas, analizando esta variable en Sí/No

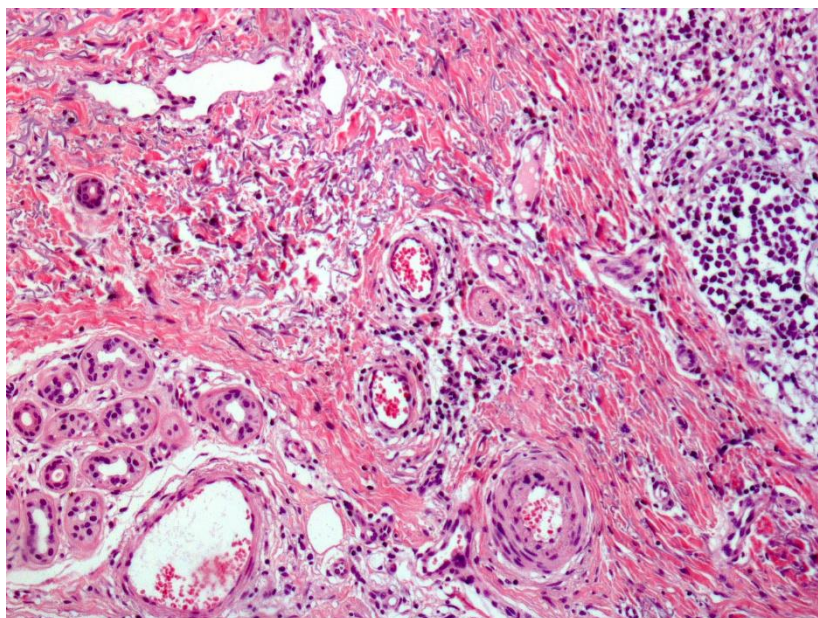


Fig. 16. Neoangiogénesis en la periferia del tumor.

Infiltración linfocitaria: Se analizó la presencia de infiltrado linfocitario en la periferia de los agregados neoplásicos o salpicando el interior de dichos agregados. Cuando existía infiltrado linfocitario, se subdividió en tres intensidades, considerando el infiltrado como escaso, moderado o intenso por comparación entre los distintos casos de la serie, y se describió dónde estaba localizado este infiltrado separándolo en tres categorías, que incluían intratumoral, peritumoral o en ambas localizaciones.

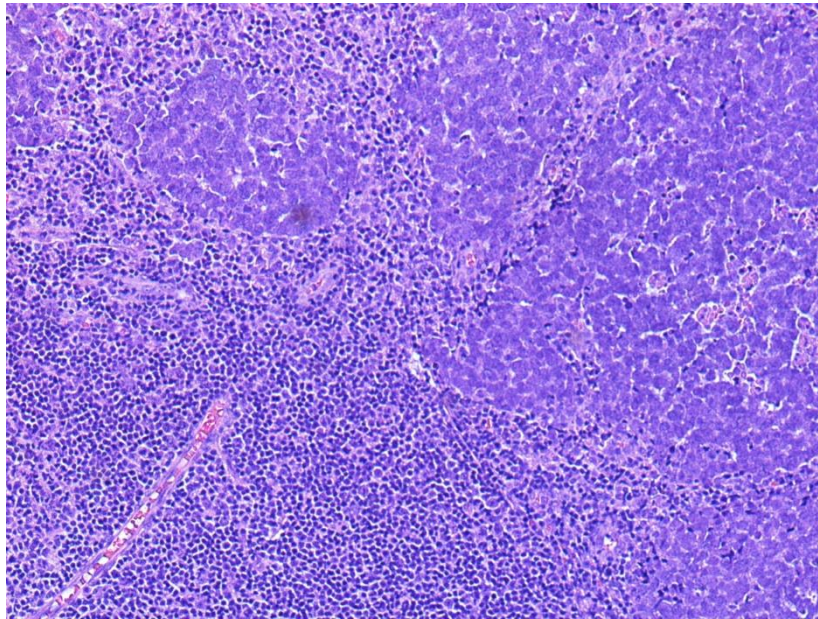


Fig.17. Infiltrado linfocitario intenso intratumoral.

Mitosis: Se contabilizó el número de células neoplásicas en mitosis, clasificando este parámetro en escasas (alguna figura de mitosis aislada por 10 campos de gran aumento), moderadas (más de 5 mitosis por 10 campos de gran aumento) o abundantes (más de 10 figuras de mitosis por 10 campos de gran aumento).

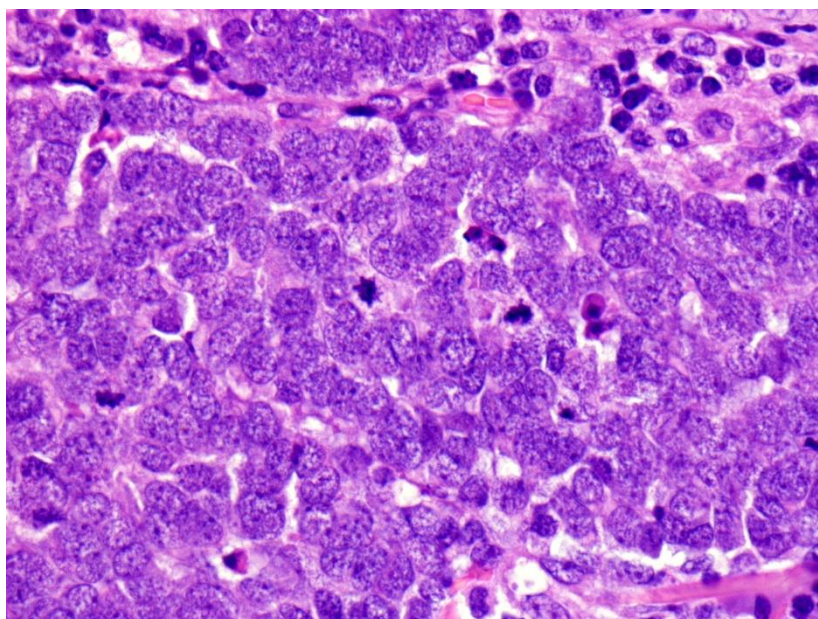


Fig. 18. Mitosis en los agregados de células neoplásicas.

Elastosis actínica: Se valoró la presencia de elastosis actínica en la dermis peritumoral en Sí/No y, cuando estaba presente, se subclasificó esta elastosis en moderada (los haces de colágeno elastótico conservaban su individualidad) e intensa (los haces de colágeno basófilo habían perdido su individualidad).

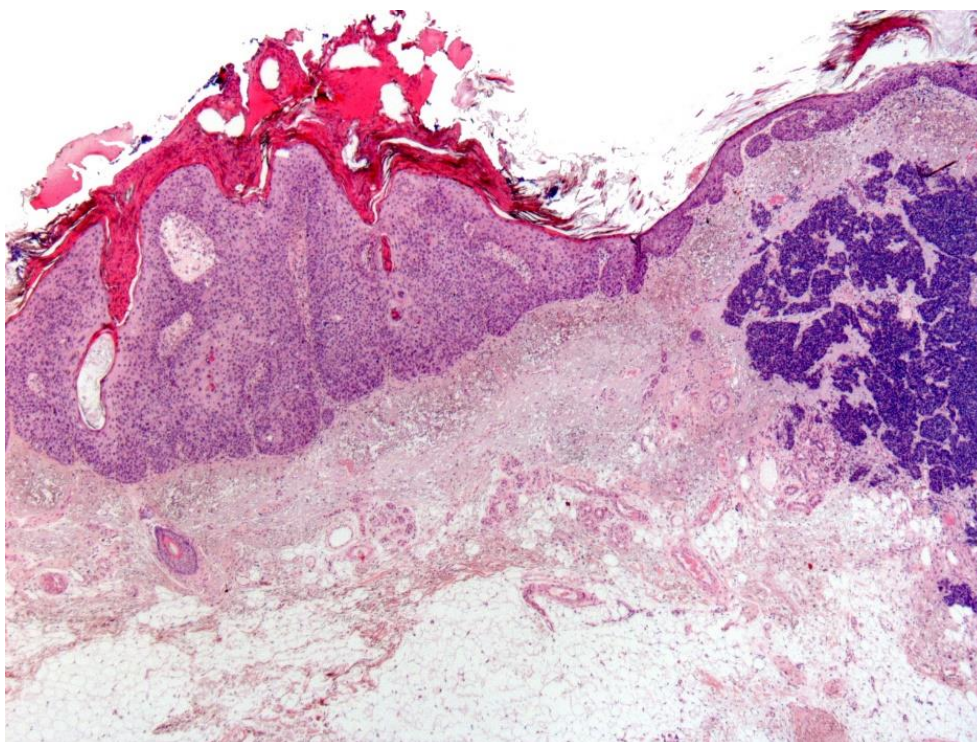


Fig. 19. Caso combinado con intensa elastosis actínica.

Colágeno esclerótico: Se estudió la presencia de haces de colágeno grueso y eosinófilo o de fragmentos circulares de colágeno esclerótico (“bolas”) similares a los que se observan habitualmente en la periferia del dermatofibroma, valorándolo en Si/No.

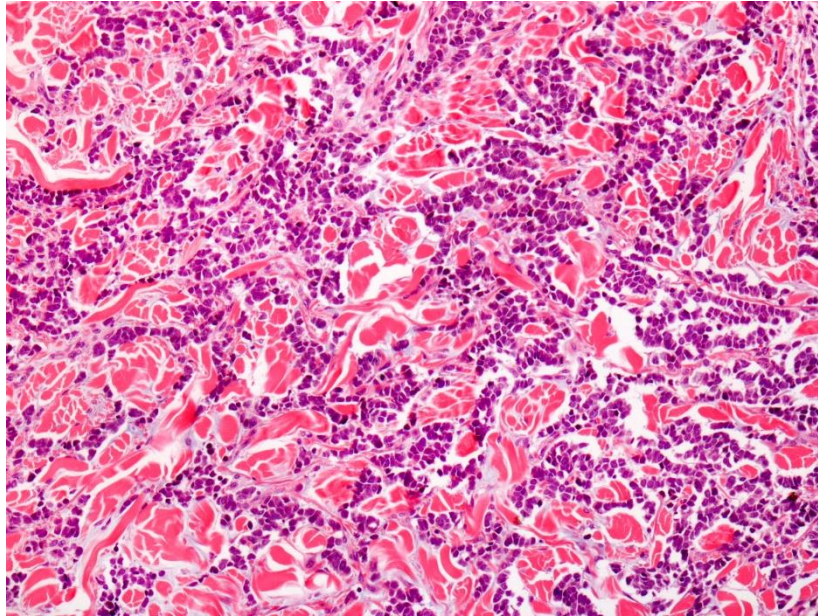


Fig. 20. Presencia de colágeno esclerótico. Fragmentos circulares de colágeno ("bolas"), similares a las que se observan habitualmente en la periferia de un dermatofibroma.

Presencia de regresión histopatológica:

No se han establecido hasta la fecha criterios de regresión histopatológica en el CCM. Definimos como regresión histológica la presencia de dos o más de los siguientes criterios:

- a. Infiltrado linfocitario.
- b. Presencia de colágeno esclerótico.
- c. Positividad de marcadores de apoptosis (caspasa 3 activa) o citotóxicos (granzima, perforina o TIA1).

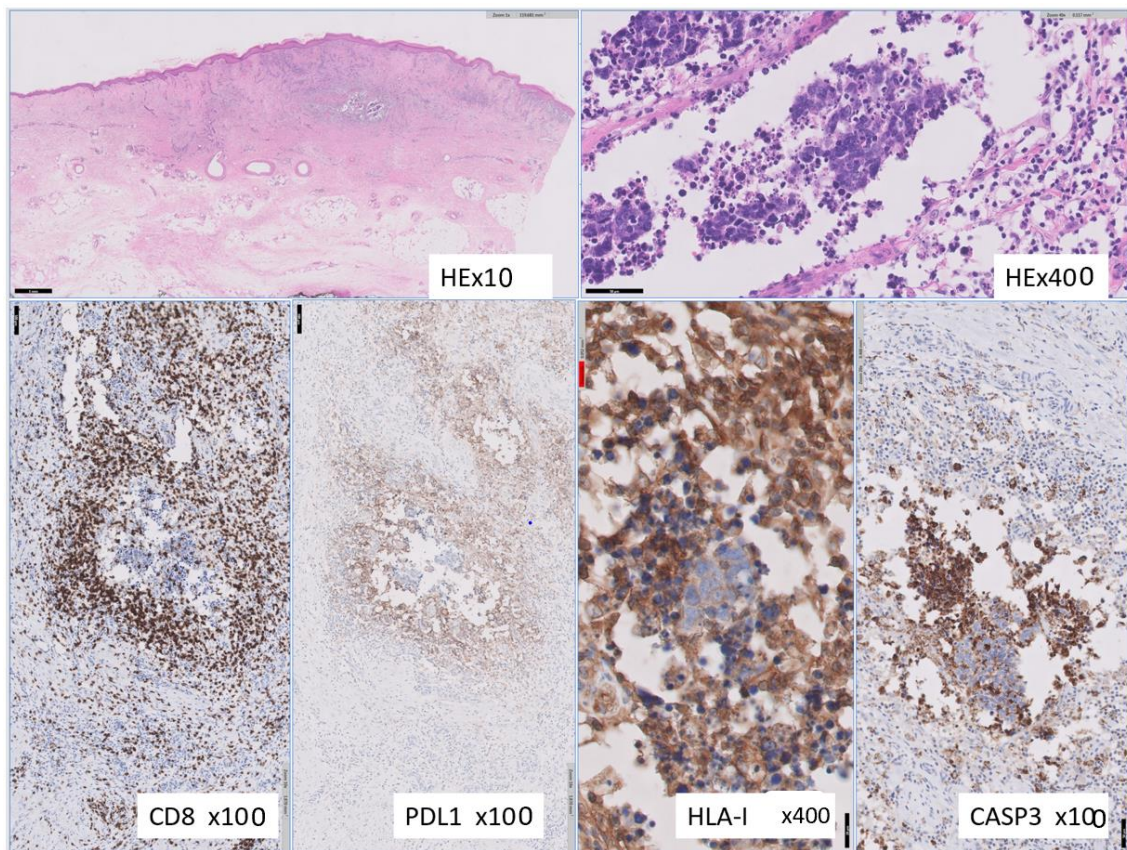


Fig. 21. Ejemplo de caso con datos de regresión. Presencia de colágeno esclerótico, abundante infiltrado inflamatorio (CD 8 + y PDL1 +) y marcador de apoptosis (caspasa 3).

3. Inmunohistoquímica:

La inmunohistoquímica se realizó en micromatrices tisulares [*tissue microarray* (TMA)]. Esta técnica consiste en obtener una matriz de un cilindro del bloque de parafina que se extrae del bloque original. Se tomó una zona de interés en este bloque que habitualmente se seleccionó en una sección teñida del mismo con hematoxilina-eosina (HE) en una preparación como guía. El cilindro de tejido se cortó y se insertó en un bloque “recipiente” de parafina, según técnica patentada por Beecher Instruments (Fig. 22). Con esta técnica de TMA se pueden incluir hasta 100 cilindros en un solo bloque de parafina. Se realizaron secciones de este bloque con un micrótopo y se montaron en preparaciones que se pueden

estudiar por microscopía óptica convencional. Dependiendo de la profundidad de los bloques donantes se pudieron obtener entre 100 y 500 secciones. Una vez construido el TMA se realizaron las tinciones de HE e inmunohistoquímica. (Fig. 22).

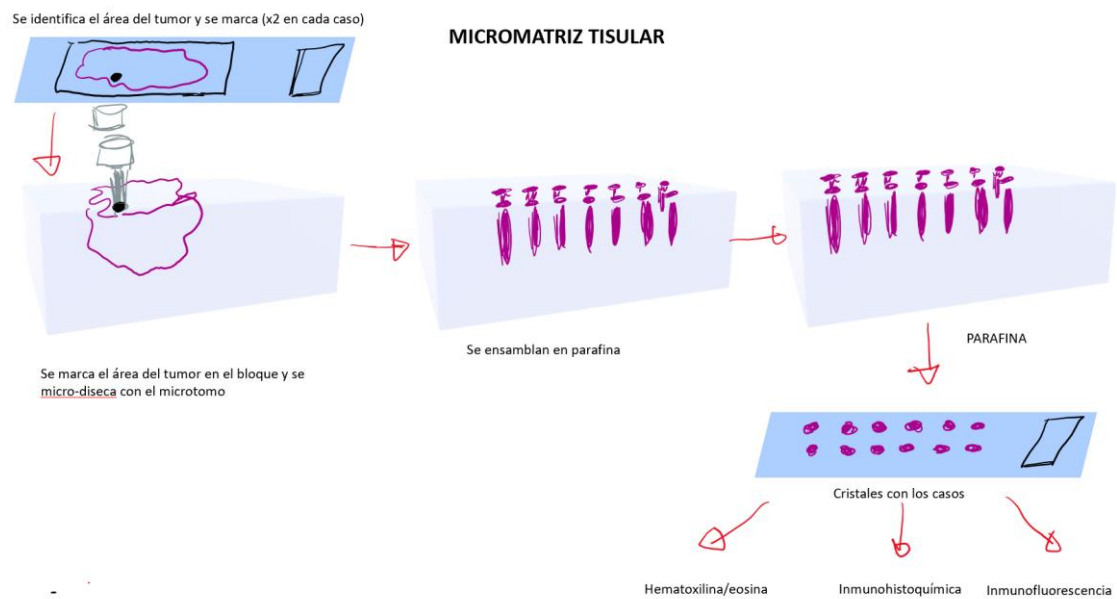


Fig. 22. Esquema gráfico de cómo se realiza una micromatriz tisular.

Se seleccionó en cada uno de los casos una sección de 1 mm en la que existía tejido tumoral, ausencia de necrosis y presencia de componente inflamatorio (si ese infiltrado existía en ese tumor concreto).

Se realizaron 5 micromatrices tisulares (TMA1, TMA2, TMA3, Galicia, Santander)

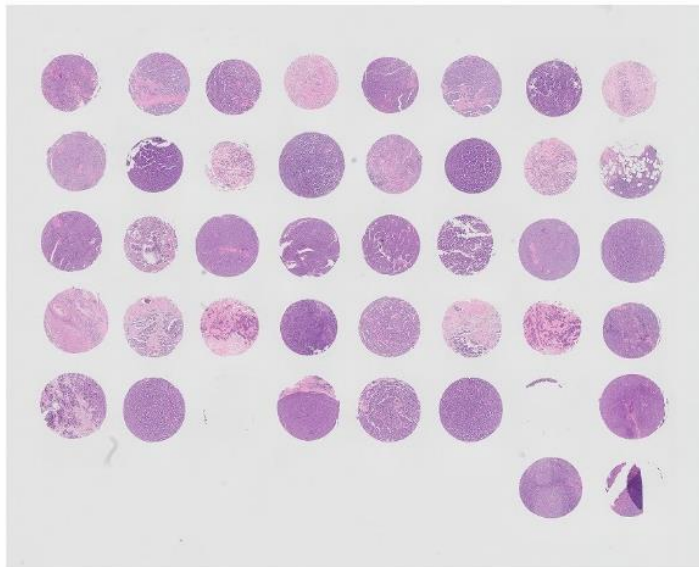


Fig. 23. Micromatriz tisular: hematoxilina-eosina. Ejemplo de una de las micromatrices (TMA 1). Esta micromatriz tiene 40 casos y dos controles (amígdalas) en la porción inferior derecha de la imagen.

Se realizó inmunohistoquímica sobre estos TMA de los componentes celulares del estroma y marcadores tumorales específicos. En concreto se analizaron los 26 marcadores siguientes: MCPyV, PD1, PDL1, FOXP3, ROR gamma, CD20, PAX5, CD4, CD8, CD3, granzima, perforina, TIA1, CD68, CD163, p53, Rb, CK20, CD56, sinaptofisina, cromogranina, Ki 67, HLA I, HLA II, ALK y EZH2.

El protocolo de inmunohistoquímica se realizó como se describe en el PDF adjunto:

<https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/128738001.PDF>

Los anticuerpos utilizados, así como sus tipos, clones, casas comerciales, referencias, controles, recuperación, amplificación, dilución, tinción y almacenamiento, se realizaron como describe la tabla adjunta:

<https://drive.google.com/file/d/1QQh0Tx89O7HDOWKW--->

[Fy373aVql4Mm6/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1QQh0Tx89O7HDOWKW---Fy373aVql4Mm6/view?usp=sharing)

Lectura y recogida de datos de cada tumor:

Se revisaron cada uno de los TMA y cada una de las tinciones separadamente por los Dres. Piris y Mendoza, y por los Dres. Santonja y Mendoza, con revisión conjunta por los tres en los casos discordantes.

Se valoraron como resultados dicotómicos los siguientes marcadores: MCPyV, CK20, p53, CD8, CD4, PAX5, CD20, PD1 y PDL1. Presencia o ausencia (se valoró como positivo o negativo)

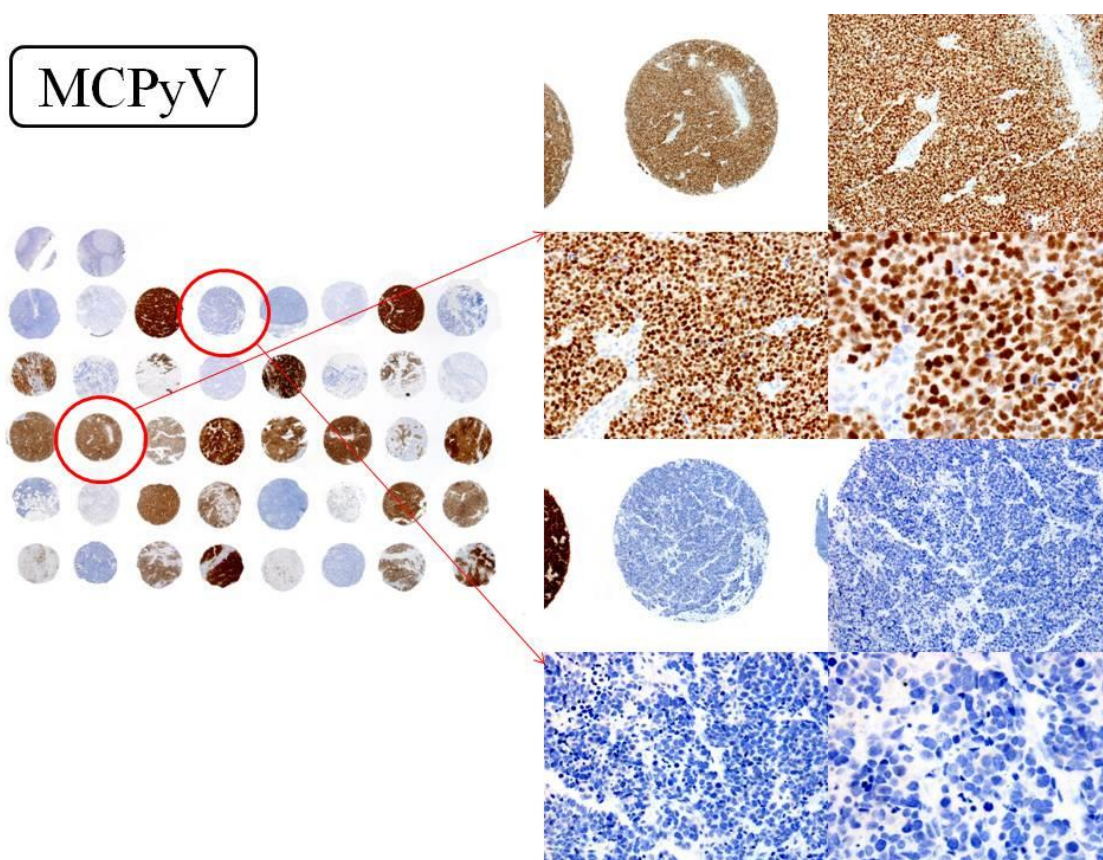


Fig. 24. Ejemplo de resultado dicotómico MCPyV: Positivo en la imagen superior y negativo en la imagen inferior.

Se valoraron como resultados graduales los siguientes marcadores: Cromogranina, Sinaptofisina, ALK, EZH2, CD56, CD163, CD68, Caspasa 3 activa, TIA1, granzima, perforina, CD3, FOX P3, ROR gamma T, ki67, HLAI y HLA II. La escala de valoración de estos marcadores fue la siguiente:

Positividad intensa: Positividad en más del 25% de las células.

Positividad moderada, intermedia o baja: Positividad en menos del 25% de las células

Negatividad: Ausencia de expresión del marcador estudiado.

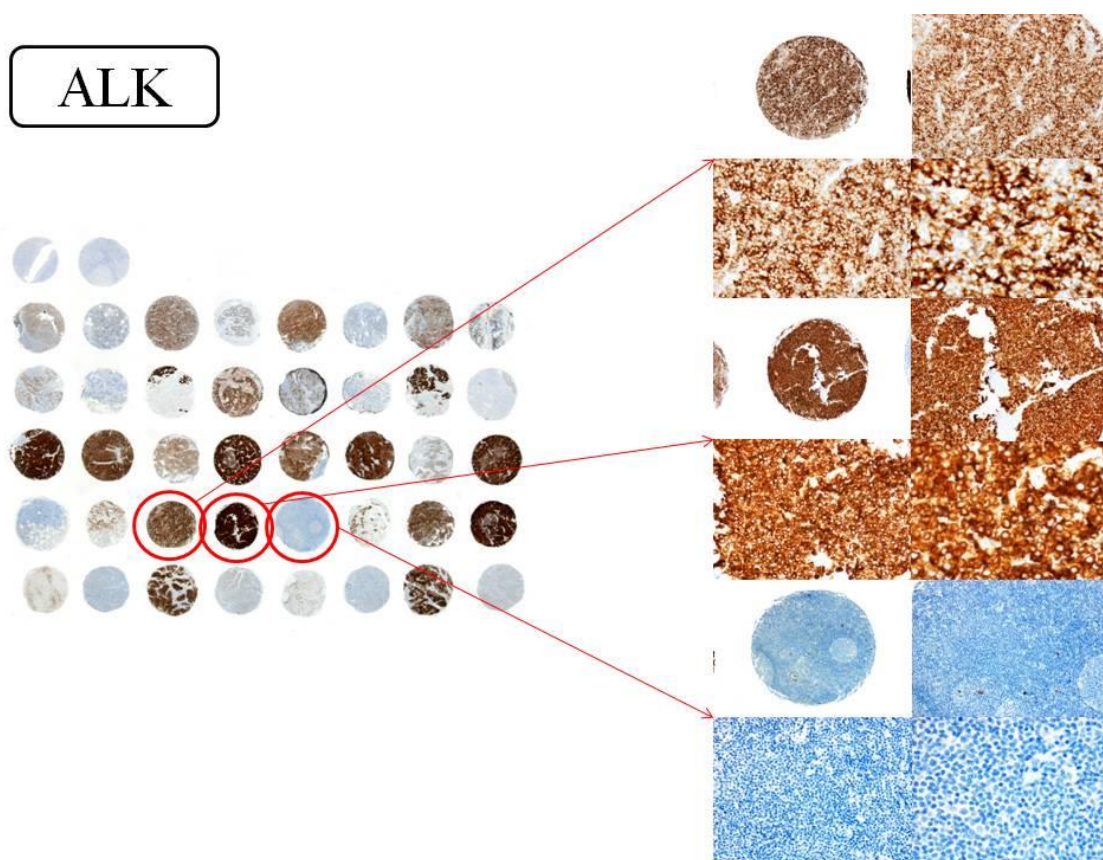


Fig. 25. Ejemplo de marcador gradual (ALK). Positividad intermedia en la imagen superior, intensa en la media y negativa en la inferior, atendiendo al porcentaje de celularidad positiva.

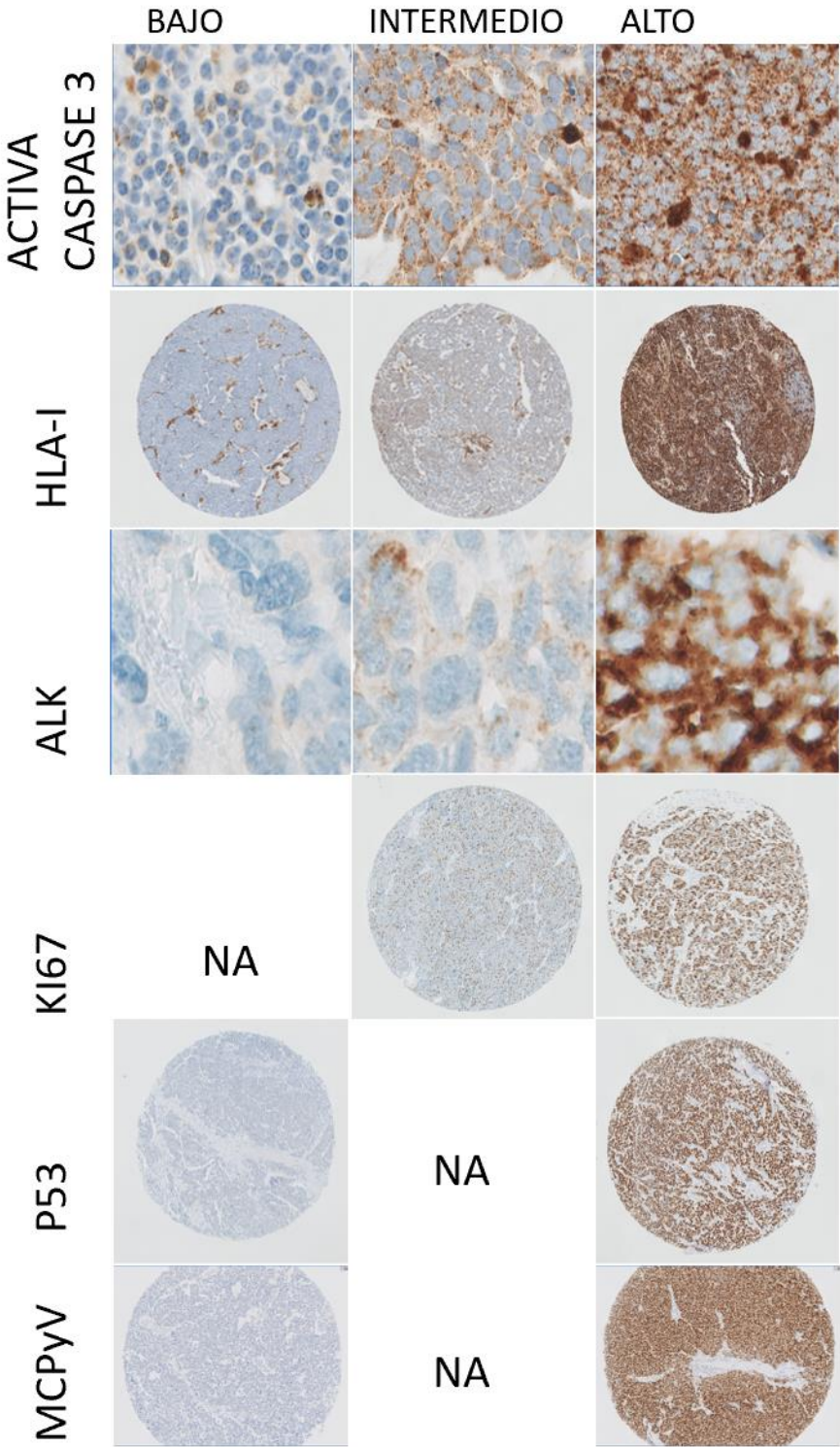
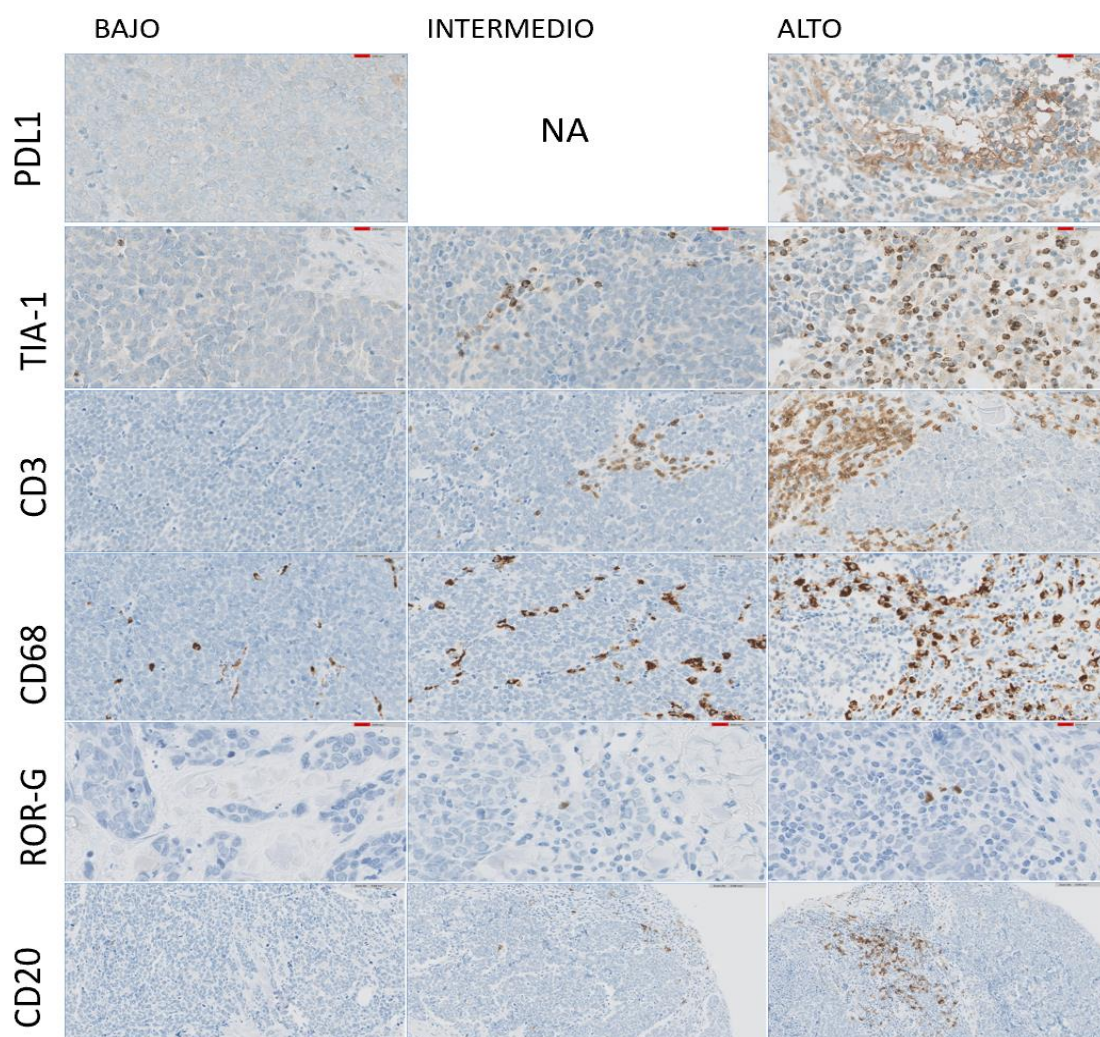


Fig. 26. Marcadores tumorales.



Marcadores estromales

Fig. 27. Marcadores estromales.

4. Secuenciación genómica masiva de una serie de casos

Se estudiaron mediante secuenciación masiva dirigida del estado mutacional de regiones específicas de 161 genes mediante el Oncomine Comprehensive Assay, Ion Torrent ION-S5 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a partir de ADN y ARN tumoral obtenido de tejido parafinado. Este panel consta de 4.648

ampliaciones que cubren zonas *hotspot* de 161 genes implicados en tumores sólidos, abarcando mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, alteración en el número de copias y traslocaciones génicas.

El análisis e interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Ion Torrent Suit 5.4.0, Ion Reporter 5.4 (ThermoFisher Scientific) y posterior validación de los datos conforme a los criterios establecidos, considerando una cobertura media de las regiones de al menos 500x y describiendo variantes con un límite de detección del 1-5% para alteraciones puntuales, 40x para fusiones intergénicas, 1000x para fusiones intragénicas y ≥ 5 copias para CNVs.

La técnica empleada presenta limitaciones inherentes al propio ensayo, incluyendo, de manera ocasional, baja cobertura de algunas regiones estudiadas.

La clasificación e informe de los resultados obtenidos se basó en las guías de estandarización publicadas por la Asociación de Patología Molecular y el Colegio Americano de Patólogos (AMP y CAP) (98).

5. Análisis estadístico:

La descripción de los valores cuantitativos se realizó mediante los estudios estadísticos descriptivos de la media y desviación típica. Como era posible que las distribuciones de los datos no siguieran una distribución Gaussiana, se incluyeron también otros valores estadísticos significativos, como la mediana y el intervalo intercuartílico, así como los valores máximo y mínimo.

Las distribuciones de variables categóricas se describieron por medio de frecuencias absolutas y relativas de la distribución.

La descripción gráfica de las variables cuantitativas se llevó a cabo mediante gráficos de cajas y bigotes (Gráficos de Box plot), indicándose la información que se muestra en la figura siguiente:

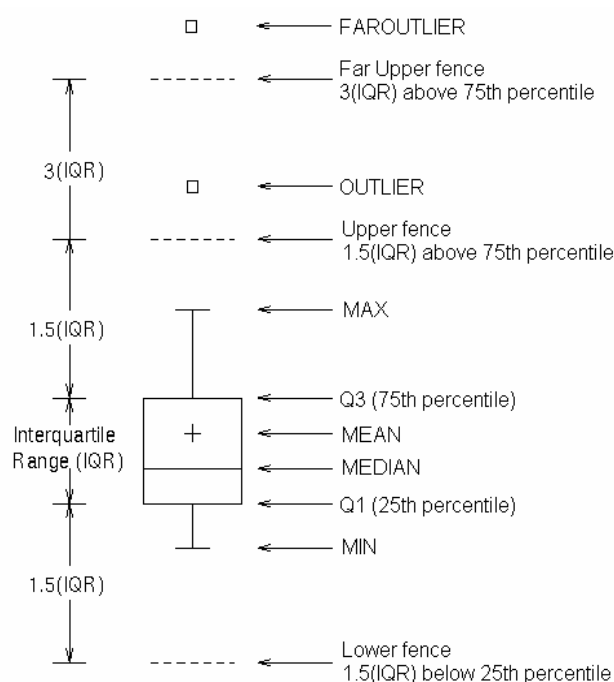


Fig. 28. Descripción gráfica de las variables cualitativas.

La descripción gráfica de las variables categóricas se llevó a cabo mediante el uso de gráficos de barras o gráficos de sectores.

Para analizar las diferencias entre los casos MCPyV positivos y negativos respecto a características clínicas, biológicas, histológicas y moleculares del tumor, se utilizaron tablas de contingencia y se realizó el test chi-cuadrado para confirmar la existencia de patrones diferentes. El mismo tipo de análisis se llevó

a cabo para relacionar la presencia de mutación somática con marcadores linfocitarios e histiocitarios, al igual que la regresión histopatológica.

Para estudiar el pronóstico de la enfermedad, se utilizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, utilizando el test log-rank para comparar la supervivencia entre distintos grupos de interés.

6. Aspectos éticos:

Todo el estudio se realizó de acuerdo con los principios y recomendaciones de buenas prácticas clínicas y según la ley de protección de datos de los pacientes.

Se incluye a continuación el certificado correspondiente.

https://drive.google.com/file/d/1PG8TKWho1iReOg_rloPWeV9F7SAULEGK/view?usp=sharing

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE:

A continuación, se describen las frecuencias de las variables estudiadas:

a. Variables clínicas

[Como se ha especificado en Material y Métodos: En los casos procedentes del Dermatopathology Laboratory de Friedrichshafen (Alemania) los únicos datos clínicos que pudieron obtenerse fueron el sexo y la edad del paciente, la localización de la lesión y la fecha de diagnóstico. Por lo tanto, los resultados se analizan sobre la n total recogida en cada una de las variables].

En cada variable se contabilizó la n total en la que teníamos datos de cada una de las variables estudiadas. Al tratarse de una muestra muy heterogénea la n total de cada variable difería de unas a otras.

Nuestra serie incluyó un total de 219 pacientes, de los cuales 205 presentaron carcinoma de células de Merkel confirmado histopatológicamente y con muestra adecuada para el estudio. Estos pacientes tenían diferentes procedencias. *(Especificadas en material y métodos, Fig.5)*. De los 196 pacientes en los que aparece recogido el sexo, 115 (58.7%) fueron mujeres y 81 (41.3%) eran hombres:

Sexo (n =196)

SEXO	Frecuencia	Porcentaje
Hombre	81	41.3
Mujer	115	58.7

Tabla 4. Distribución de casos por sexo.

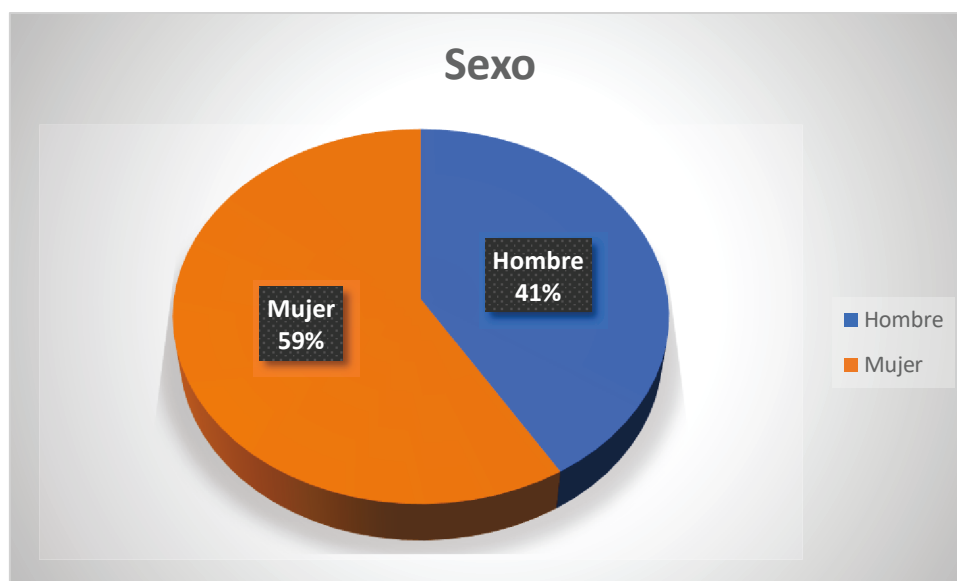


Fig. 29. Distribución de casos por sexo.

Edad (n=190)

La edad media fue de 78.67 años con un rango oscilando entre 48 y 105 años.

variable	N	media	ds	min	max	p25	p50	p75
EDAD	190	78.67	10.10	48.00	105.19	73.00	79.55	85.98

Tabla 5. Distribución de casos por edad

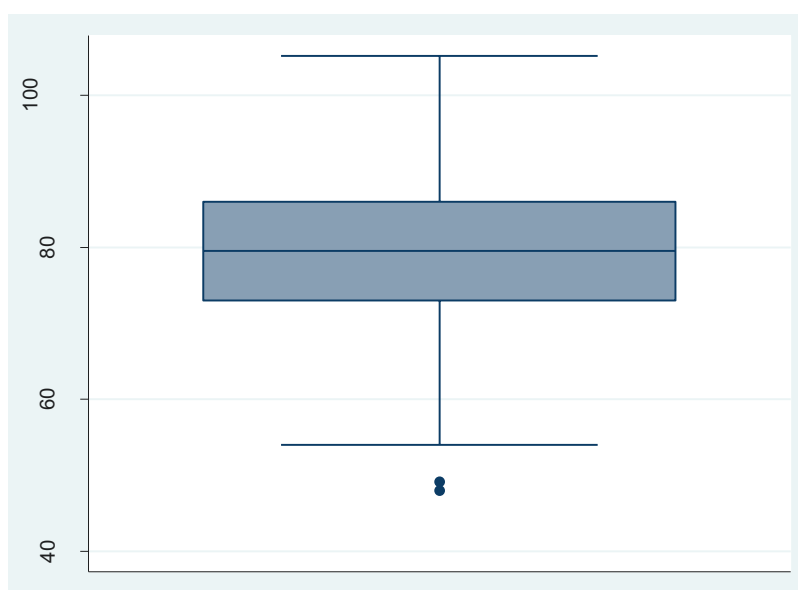


Fig. 30. Distribución de casos por edad.

Localización (n=168):

La localización más frecuente del tumor fue cabeza y cuello, con un total del 45.2% de la muestra, seguido de las extremidades inferiores (siendo un 35.1%).

*En cuanto a los 3 que aparecieron en ganglio, dos eran metástasis ganglionares de un CCM cutáneo y uno era primario ganglionar.

Localización	Frecuencia	Porcentaje
Cabeza y cuello	76	45.2
Tronco	7	4.2
EESS	23	13.7
EEII	59	35.1
Ganglio linfático*	3	1.8

Tabla 6. Distribución de casos según la localización.

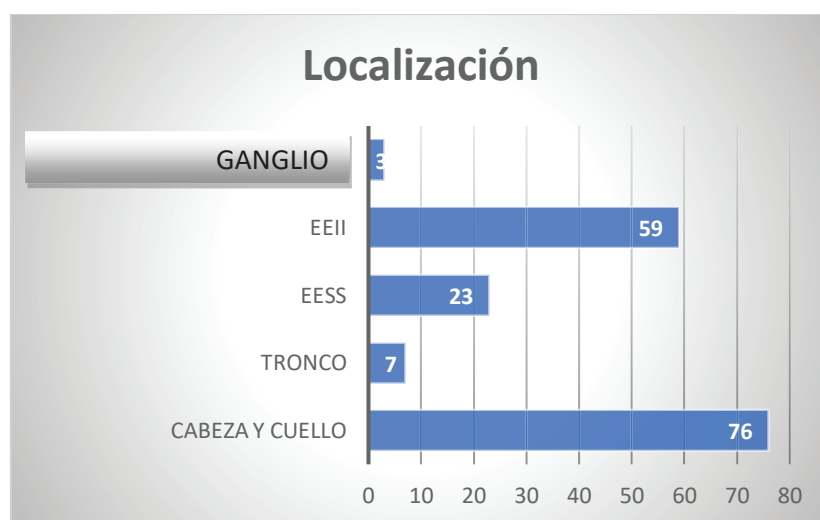


Fig. 31. Distribución de casos según la localización.

Estadio tumoral (n=76):

Con respecto a los estadios tumorales (n=76), según la AJCC (8ª edición), nuestros casos mostraban una distribución muy similar entre los distintos estadios, como podemos observar en la siguiente tabla.

Estadio AJCC	Frecuencia	Porcentaje
I	14	18.4
II	21	27.6
III	22	28.9
IV	19	25.0

Tabla 7. Distribución de casos según el estadio de la AJCC (8ª edición).

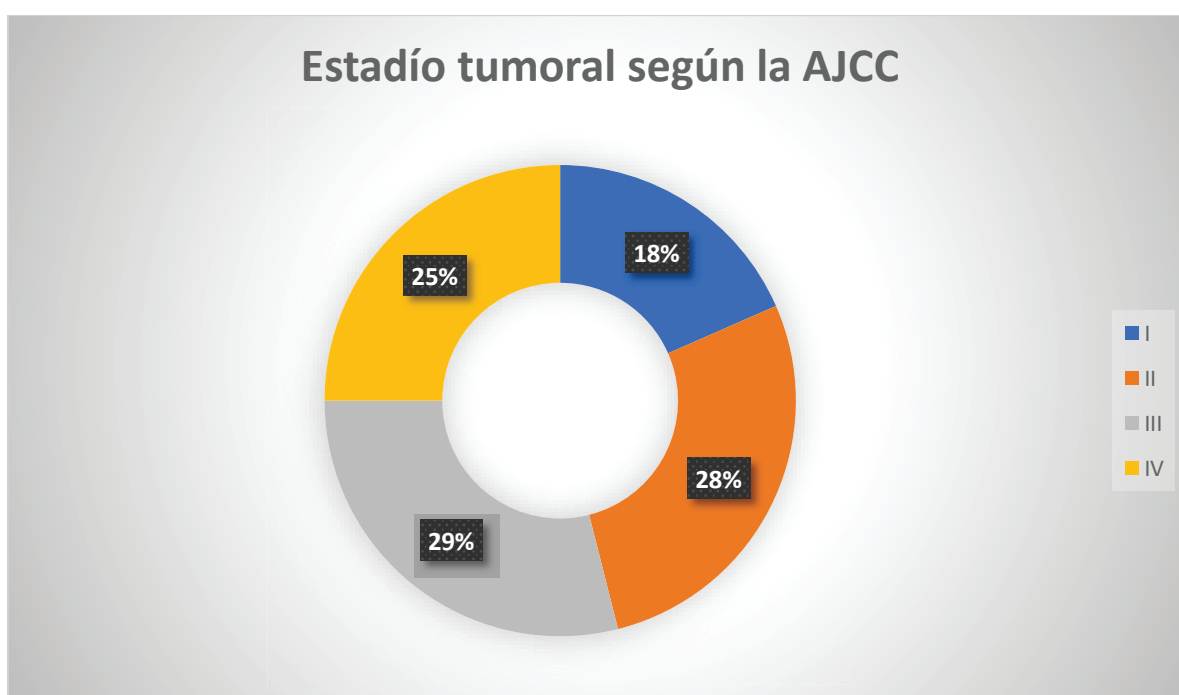


Fig. 32. Distribución de casos según el estadio de la AJCC (8ª edición).

Inmunosupresión (n=97):

De todos los pacientes (n=97), 18 estaban inmunosuprimidos, lo que corresponde a un 18.6% de la muestra. Los diferentes tipos de inmunosupresión que presentaban estos pacientes se especifican en la siguiente tabla de distribución.

TIPO DE INMUNOSUPRESIÓN	NUMERO DE CASOS	PORCENTAJE
Trasplantados de órgano sólido	4	22.2%
Neoplasias hematológicas	6	33.3%
Neoplasia de órgano sólido	5	27.8%
Fármacos	1	5.6%
Artritis reumatoide	2	11.1%

Tabla 8. Casos de pacientes inmunosuprimidos y distribución según la inmunosupresión presentada.

Quimioterapia (n=80):

Doce pacientes fueron tratados con quimioterapia (15%). Dos pacientes fueron tratados con Cisplatino + Etopósido, tres pacientes con cbdca-vp-16 y 1 paciente con cim-vp-16. En el resto de los pacientes desconocemos el tipo de quimioterapia administrada.

Quimioterapia	Frecuencia	Porcentaje
No	68	85.0
Sí	12	15.0

Tabla 9. Casos tratados con quimioterapia.

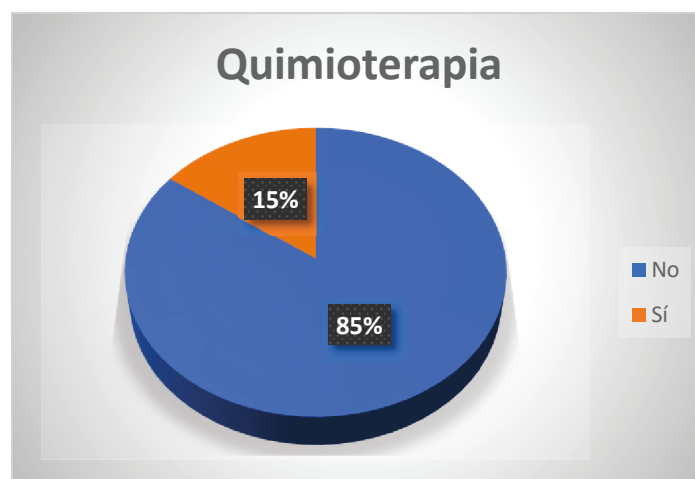


Fig. 33. Casos tratados con quimioterapia.

Radioterapia (n=82):

La frecuencia de administración de radioterapia fue de un 46.4%. La dosis administrada en los pacientes fue de 45-50 Gy.

Radioterapia	Frecuencia	Porcentaje
No	44	53.7
Sí	38	46.3

Tabla 10. Casos tratados con radioterapia.

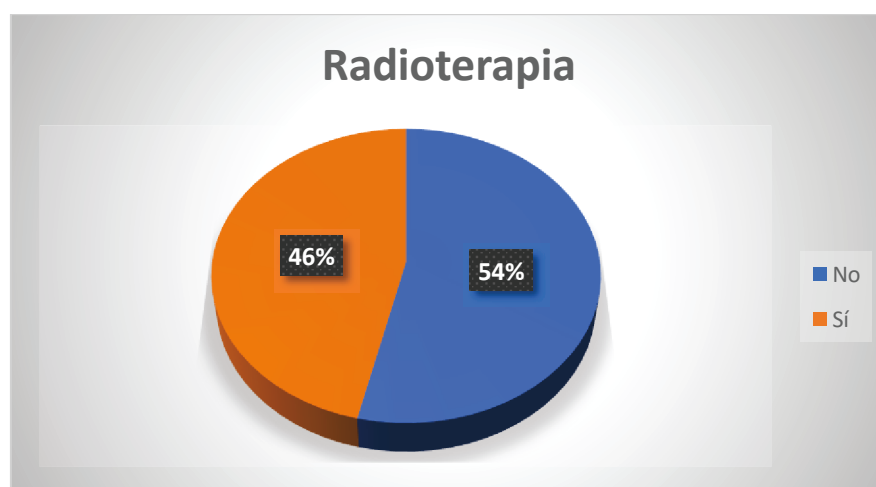


Fig. 34. Casos tratados con radioterapia.

De 50 pacientes que tenemos recogida información sobre metástasis o recidiva del tumor, hemos observado la aparición de alguno de estos dos factores en 24 pacientes (48%).

Además, 29 pacientes fallecieron como consecuencia de tumor, lo que representa un 51.8% de los registros conocidos (n total fallecidos= 56). Por otro lado, encontramos también un alto porcentaje de fallecimientos debido a otras causas, seguramente como consecuencia de la edad avanzada y la pluripatología de los pacientes estudiados.

Muerte por tumor	Frecuencia	Porcentaje
No	27	46.2
Sí	29	51.8

Tabla 11. Casos fallecidos por causa del tumor.

Finalmente, en nuestro análisis la variable que recoge la progresión del paciente se refleja en la siguiente tabla (n=86). Un 65.1% de fallecidos y un 3.5% de vivos pero con enfermedad.

Estado	Frecuencia	Porcentaje
Muerto	56	65.1
Vivo	27	31.4
Vivo con enfermedad	3	3.5

Tabla 12. Progresión del paciente.

b. Variables histopatológicas

***Nota: Desde el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander (HUMV) se recibió sólo un TMA, IVO: Instituto Valenciano de Oncología, PH: Hospital Puerta de Hierro, HXIC: Hospital Xeneral Islas Cíes, Anderson: Clínica Anderson, HVST: Hospital Virgen de la Salud de Toledo. Al no disponer de los bloques de algunos casos no pudimos estudiar en todos los casos las variables histopatológicas que se detallan a continuación. Por este motivo la n es menor que en el siguiente apartado.*

El patrón de crecimiento nodular es el que predominaba en nuestra serie y representaba un 77.8% de los casos, seguido del patrón trabecular con un 13.2% de los casos y una combinación de ambos patrones se observó en un 9% de los casos.

La mayoría de los tumores infiltraban la hipodermis (57.9%), seguidos de los confinados sólo a la dermis (28.2%) y de los que infiltraban más profundamente alcanzando el músculo esquelético (13.2%).

Destacaba que un 14.5% de los casos presentaron un patrón combinado y un 85.5% presentaban un patrón puro. Un 42.2% de los tumores presentan áreas de necrosis y un 20.6% ulceración.

El epidermotropismo era muy infrecuente, observándose sólo en un 3.4% de los casos.

Un 25.6% de los casos presentaron infiltración linfovascular, analizando sólo los cortes teñidos con hematoxilina-eosina.

Neoangiogénesis se observó en un 17.3% de los casos, principalmente en la periferia del tumor.

En cuanto al infiltrado inflamatorio acompañante, este era mayoritariamente linfocitario, siendo escaso en el 40,3%, moderado en el 32.8% e intenso en el 26.9% de los casos.

Un 33.6% de los casos presentaban elastosis actínica intensa en la dermis peritumoral, un 21.6% de los casos mostraba elastosis actínica moderada y en el 44.8% de los casos no se observó elastosis actínica o esta era muy ligera.

Un 31.8% de los casos estudiados presentaba numerosas mitosis, un 48.5% mitosis moderadas y un 26% presentaba escasas mitosis.

Colágeno esclerótico peritumoral o entre los agregados neoplásicos se observó en un 28.7% de los casos.

Un 47.3% de los casos mostraba signos histopatológicos de regresión.

Se detallan a continuación los hallazgos histopatológicos analizados y sus frecuencias en la siguiente tabla.

VARIABLES	SI	NO	
Neoplasia combinada	19 (14.5%)	112 (85.5%)	
Invasión linfovascular	34 (25.6%)	99 (74.4%)	
Necrosis	56 (42.4%)	76 (57.6%)	
Ulceración	27 (20.6%)	104 (79.4%)	
Neoangiogénesis	23 (17.3%)	110 (82.7%)	
Epidermotropismo	4 (3.4%)	114 (96.6%)	
Colágeno esclerótico	35 (28.7%)	87 (71.3%)	
Regresión	97 (47.3%)	108 (52.7%)	
Patrón de crecimiento	Nodular 112 (77.8%)	Trabecular 19 (13.2%)	Mixto 13 (9%)
Infiltrado linfocitario	Escaso 54 (40.3%)	Moderado 44 (32.8%)	Intenso 36 (26.9%)

Localización infiltrado linfocitario	Central 2 (9.5%)	Periférico 19 (90.5%)	
Infiltración en profundidad	Dermis 22 (28.9%)	Hipodermis 44 (57.9%)	Músculo 10 (13.2%)
Elastosis actínica	Intensa 42 (33.6%)	Moderada 27(21.6%)	Escasa o ausente 56 (44.8%)
Mitosis	Abundantes 42(31.8%)	Moderadas 64(48.5%)	Escasas 26 (19.7%)

Tabla 13. Hallazgos histopatológicos estudiados y distribución de los mismos.

c. Variables inmunohistoquímicas

MARCADORES PROPIOS DEL TUMOR

Se analizaron los siguientes marcadores propios del tumor:

CK20, sinaptofisina, cromogranina, MCPyV, p53, ALK, EZH2, CD56.

Cabe destacar la positividad para MCPyV en un 57% de los casos y su negatividad en un 43% de los mismos.

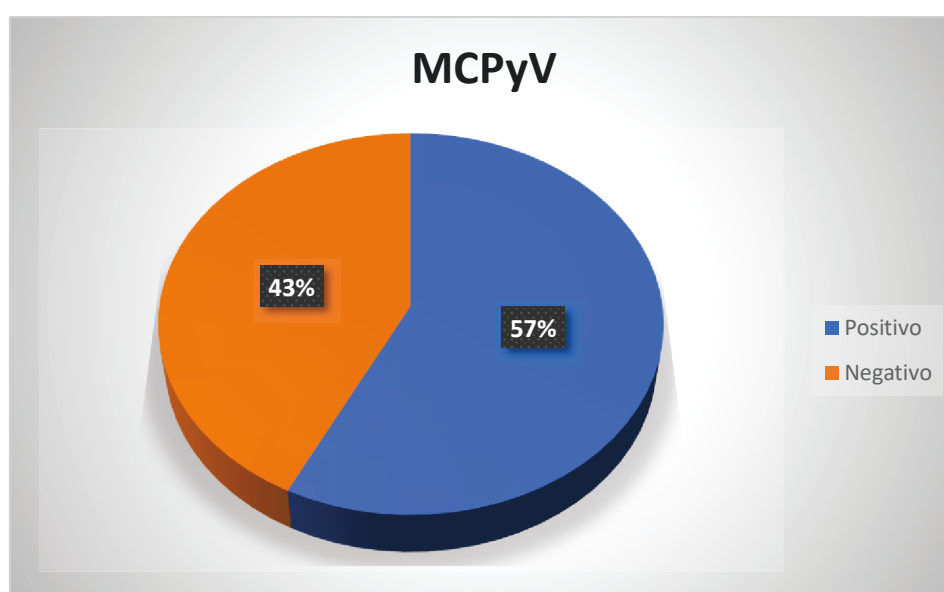


Fig. 35. Distribución de los casos según su positividad a MCPyV.

En cuanto a la CK20, destacaba la negatividad de la misma en un 14.8% de los casos.

En cuanto a la expresión de p53, se encontró en un 22.2% de los casos. Un 10.9% de los casos mostraban una positividad débil de cromogranina, mientras que un 5.5% de casos presentaban una positividad débil de sinaptofisina. Sólo un 8.6% de los casos de la serie resultaron negativos para ALK y un 2.3% de los casos fueron negativos para EZH2, por lo que destaca una mayoría muy significativa de los casos con expresión moderada o intensa de ALK (91.4%) y de EZH2 (97.7%). En cuanto a PAX5, estaba presente en un 59% de los casos.

Todos los resultados inmunohistoquímicos aparecen detallados en la siguiente tabla:

MARCADOR	POSITIVOS	NEGATIVOS	INTERMEDIOS
CK20	155 (85.2%)	27 (14.8%)	-
Sinaptofisina*	124 (75.6%)	9 (5.5%)	31 (18.9%)
Cromogranina*	115 (62.5%)	20 (10.9%)	49 (26.6%)
MCPyV	101 (57%)	75 (43%)	
p53	40 (22.2%)	140 (77.8%)	-
ALK	120 (69%)	15 (8.6%)	39 (22.4%)
EZH2	158 (90.8%)	4 (2.3%)	12 (6.9%)
Ki 67	35 (25.4%)	0 (0%)	103 (74.6%)
CD56	109 (62.3%)	25 (14.3%)	41 (23.4%)
PAX5	108 (59%)	75 (41%)	-

Tabla 14. Marcadores propios del tumor y frecuencia de los mismos. *En estos casos el apartado "NEGATIVO" se refiere a expresión muy baja del marcador.

MARCADORES DEL ESTROMA:

- Se analizaron los siguientes **marcadores linfocitarios**: CD3, CD4, CD8, CD20, PAX5, FOXP3, ROR gamma y PD1, observándose una intensa positividad de marcadores linfocitarios en el estroma de este tumor.

En cuanto a los marcadores de linfocitos T, destacaba la positividad de CD3 en un 63.4% de los casos (positividad intensa o intermedia), de CD8 en un 62.8% de los casos y de CD4 en un 53.6% de los casos.

Destacaba también una frecuente positividad de marcadores de linfocitos T reguladores en el infiltrado, con una positividad (intensa o intermedia) de un 48% de los casos.

Se observó una menor presencia de linfocitos B en el estroma tumoral, con una positividad sólo en el 27.7% de los casos.

A continuación, se resumen en la siguiente tabla todos los datos de los marcadores inmunohistoquímicos linfocitarios del infiltrado en el estroma tumoral:

MARCADOR	POSITIVO	NEGATIVO	INTERMEDIO
CD3	51 (29.1%)	64 (36.6%)	60 (34.3%)
CD4	97 (53.6%)	84 (46.4%)	-
CD8	114 (62.8%)	66 (36.7%)	-
CD20	49 (27.7%)	128 (72.3%)	-
FOXP3	76 (42.9%)	92 (52%)	9 (5.1%)
ROR gamma	23 (12.8%)	153 (85%)	4 (2.2%)
PD1	81(46%)	95 (54%)	-

Tabla 15. Marcadores linfocitarios y distribución de los mismos.

- **Marcadores histiocitarios:** CD68, CD163

Destacaba la frecuente presencia de histiocitos en el infiltrado del estroma tumoral, ya que sólo en un 2.3% de los casos se observó negatividad de CD68 y sólo en el 6.7% de los casos no existía expresión de CD163. Se presentan todos los datos en la siguiente tabla:

MARCADOR	POSITIVO	NEGATIVO	INTERMEDIO
CD68	49 (27.5%)	5 (2.3%)	124 (69.7%)
CD163	69 (38.3%)	12 (6.7%)	99 (55%)

Tabla 16. Marcadores histiocitarios y frecuencia de los mismos.

- **Marcadores citotóxicos:** Granzima, Perforina, TIA1.

El hallazgo más llamativo consistía en la frecuente falta de expresión de perforina, que resultó negativa en el 82.7% de los casos

MARCADOR	POSITIVOS	NEGATIVOS	INTERMEDIOS
Granzima	23 (12.9%)	82 (46.1%)	73 (41%)
Perforina	16 (14.6%)	91 (82.7%)	3 (2.7%)
TIA1	43 (24.3%)	41 (23.2%)	93 (52.5%)

Tabla 17. Marcadores citotóxicos y presencia de los mismos.

- **Marcadores de apoptosis:** Caspasa 3 activa.

Destacaba la elevada frecuencia de expresión de caspasa 3 activa en el estroma, con una positividad intensa en un 65.7% de los casos y una positividad intermedia en un 29.9% de los casos.

MARCADOR	POSITIVOS	NEGATIVOS	INTERMEDIOS
Caspasa 3	90 (65.7%)	6 (4.4%)	41 (29.9%)

Tabla 18. Marcador de apoptosis y distribución del mismo en los casos.

- **Antígenos de histocompatibilidad. HLA I, HLA II**

MARCADOR	POSITIVOS	NEGATIVOS	INTERMEDIOS
HLA I	49 (27.2%)	78 (43.3%)	53 (29.4%)
HLA II	1 (0.6%)	178 (98.9%)	1 (0.6%)

Tabla 19. Antígenos de histocompatibilidad.

- Regulación de respuesta inmune: PDL1.

MARCADOR	POSITIVOS	NEGATIVOS	INTERMEDIOS
PDL1 tumor	22 (12.3%)	157 (87.7%)	-
PDL1 estroma	93 (52.8%)	83 (47.2%)	-

Tabla 20. Marcadores de regulación de respuesta inmune.

d. Pronóstico

Con respecto al pronóstico de la enfermedad, la figura siguiente muestra la curva de supervivencia de la enfermedad estimada mediante el método de Kaplan-Meier. El tiempo mostrado en el eje horizontal está medido en meses.

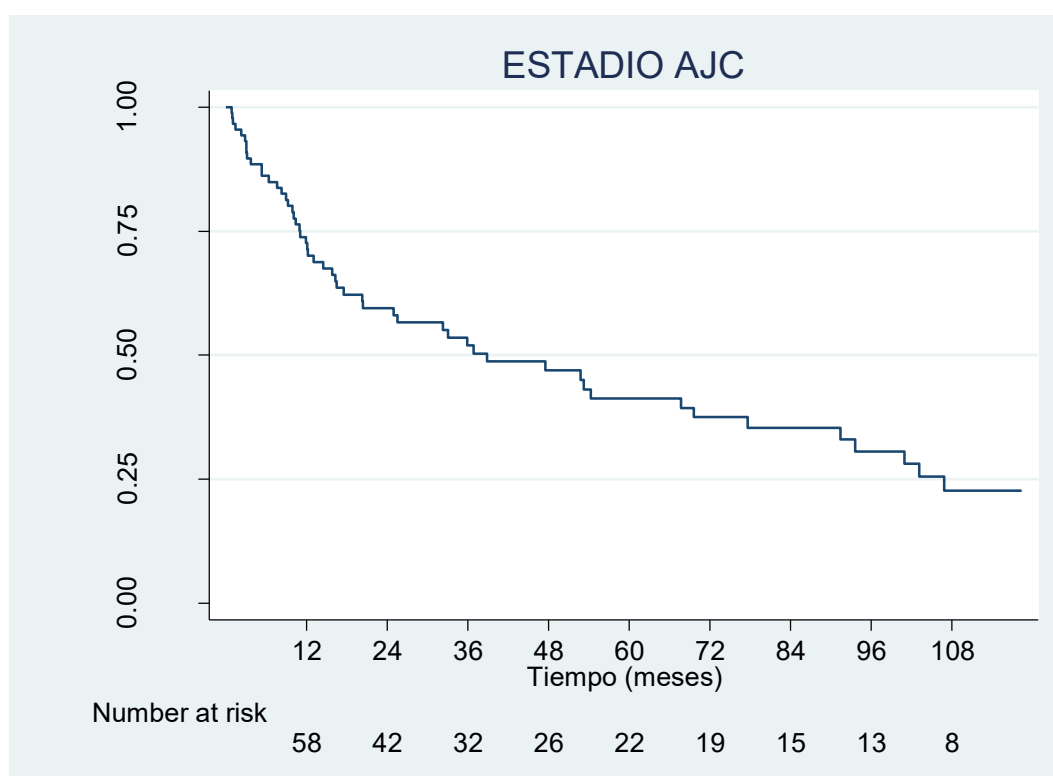


Fig. 36. Curva de supervivencia.

5. 2. DIFERENCIAS ENTRE LOS CASOS POLIOMAVIRUS POSITIVOS Y NEGATIVOS

a. Variables histopatológicas.

Se encontró una frecuencia muy baja de MCPyV en los casos combinados (2.9% frente a 31.5% de los casos puros) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$).

En cuanto al infiltrado linfocitario, los pacientes con tumores positivos para MCPyV mostraban una mayor densidad de infiltrado linfocitario que los negativos (35.2% frente a 14.3%, $p=0.013$).

Los pacientes con tumores positivos para MCPyV mostraban una menor tasa de ulceración que los negativos (5.9% frente a 39.3%, $p=0.000$).

De la misma manera, los tumores positivos para MCPyV mostraban una menor intensidad de elastosis actínica (41.5% frente a 71.7%, $p=0.001$).

Al final de cada tabla, se refleja el valor del estadístico chi-cuadrado y su p valor que, cuando es menor de 0.05, apoya que la distribución de la característica es diferente en MCPyV positivo frente a negativo. Figuran en negrita las variables que son estadísticamente significativas.

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
combinado clásico	Combinados: 19 (15.3%)	2 (2.9%)	17 (31.5%)	0.000	19.2505
	Clásicos: 105 (84.7%)	68 (97.1%)	37 (68.5%)		
Infiltrado linfocitario	Escaso: 53 (41.7%)	23(32.4%)	30(53.6%)	0.013	8.6407
	Moderado: 41(32.3%)	23(32.3%)	18(32.1%)		

	Intenso: 33 (26%)	25(35.2%)	8 (14.3%)		
Ulceración	Sí: 26 (21%)	4 (5.9%)	22 (39.3%)	0.000	20.6776
	No: 98 (79%)	64(94.1%)	34 (60.7%)		
Elastosis actínica	Sí: 65 (55.1%)	27 (41.5%)	38 (71.7%)	0.001	10.7333
	No: 53 (44.9%)	38 (58.5%)	15 (28.3%)		

Tabla 21. Variables histopatológicas estadísticamente significativas en función de la expresión de MCPyV.

En cuanto al resto de variables histopatológicas analizadas, que incluían patrón de crecimiento, invasión linfovascular, necrosis, mitosis, neoangiogénesis, epidermotropismo, presencia de colágeno esclerótico y profundidad; no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los casos positivos y negativos para MCPyV. En la tabla siguiente se especifican los resultados obtenidos.

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
Patrón de crecimiento	Nodular: 107 (78.1%)	55 (73.3%)	52 (83.9%)	0.251	2.7643
	Trabecular: 18 (13.1%)	11(14.7%)	7 (11.3%)		
	Mixto: 12 (8.8%)	9 (12%)	3 (4.8%)		
Invasión linfovascular	Sí 32 (25.4%)	19(25.3%)	13 (25.5%)	0.984	0.0004
	No: 94 (74.6%)	56(74.8%)	38 (74.6%)		
Necrosis	Sí: 55 (44%)	28 (40%)	27(49.1%)	0.309	1.0331
	No: 70 (56%)	42 (60%)	28(50.9%)		

Mitosis	Abundantes: 42 (31.8%)	21(28.8%)	21(35.6%)	0.634	0.9100
	Moderadas: 64 (48.5%)	36(49.3%)	28 (47.5%)		
	Escasas: 26 (19.7%)	16(21.9%)	10 (16.9%)		
Neoangiogénesis	Sí: 22 (17.5%)	14(18.9%)	8 (15.4%)	0.607	0.2647
	No: 104 (82.5%)	60(81.1%)	44 (84.6%)		
Epidermotropismo	Sí: 4 (3.6%)	1(1.6%)	3 (6.3%)	0.192	1.7050
	No: 107 (96.4%)	62(98.4%)	45 (93.8%)		
Colágeno esclerótico	Sí: 34 (29.1%)	19(28.8%)	15 (29.4%)	0.941	0.0054
	No: 83 (70.9%)	47(71.2%)	36 (70.6%)		
Profundidad de infiltración	Dermis: 22 (31%)	13(33.3%)	9 (28.1%)	0.792	0.4673
	Hipodermis: 39 (54.9%)	20(51.3%)	19 (59.4%)		
	Músculo: 10 (14.1%)	6(15.4%)	4 (12.5%)		

Tabla 22. Variables histopatológicas sin significación estadística en función de la expresión de MCPyV.

b. Variables inmunohistoquímicas:

1. Marcadores propios del tumor:

Destacaba que los casos MCPyV positivos mostraban también positividad para la CK20 en el 93.9% de los casos, mientras que sólo un 6.1% eran CK20 negativos. En contraste, los casos negativos para MCPyV mostraban positividad para CK20 en el 73% de los casos, mientras que el 27% de estos casos eran CK20 negativos. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0.001$)

En cuanto a la expresión de p53, observamos que los tumores MCPyV positivos eran también p53 positivos sólo en el 4.1% de los casos, mientras que el 95.9% era p53 negativo. La distribución de p53 en los tumores MCPyV negativos mostraba una mucha mayor frecuencia de positividad, ya que se observó positividad para p53 en el 45.9% de los casos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. ($p < 0.001$). Por lo tanto, en cuanto a la expresión de p53 y MCPyV, nuestros casos mostraban una relación inversa.

Los casos MCPyV negativos mostraban un índice de proliferación con Ki67 más alto, 42.6%, frente a un 15.4% en los MCPyV positivos, y esta diferencia era también estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

En cuanto a la expresión de cromogranina, observamos que los tumores MCPyV positivos mostraban positividad para este marcador en el 71.7% de los casos, frente a un 47.2% de los casos MCPyV negativos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

En cuanto a la expresión sinaptofisina, observamos que los casos MCPyV positivos mostraban positividad intensa para este marcador en el 88.9% de los casos, un 2.2% mostraban expresión débil y un 8.9% positividad intermedia. La expresión de sinaptofisina en los tumores MCPyV negativos fue bastante diferente, encontrándose un 61.3% de casos positivos para sinaptofisina, un 6.5% negativos y un 32.3% con expresión intermedia de sinaptofisina, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

La expresión de ALK fue muy diferente en los tumores MCPyV positivos y los MCPyV negativos. Los casos MCPyV positivos mostraban positividad de ALK en

el 83.2% de los casos, mientras que sólo el 48.6% en los casos MCPyV negativos mostraban expresión de ALK.

Observamos que los casos MCPyV positivos mostraban positividad para CD56 en el 66.7% de los casos, mientras que el 8.3% de los casos eran CD56 negativos y el 25% mostraban positividad intermedia para CD56. La expresión de CD56 en los casos MCPyV negativos era diferente, ya que los casos CD56 positivos eran menos frecuentes (56.2%) y, sin embargo, los casos CD56 negativos eran más frecuentes que en los casos MCPyV positivos (23.3%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.025$).

Además, observamos que PAX5 era positivo en casi el doble de casos MCPyV positivos (75.5%) que en los casos MCPyV negativos (39.7%) y esta diferencia era estadísticamente significativa ($p<0.001$).

En la siguiente tabla se enumeran estos resultados:

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
CK20	Positivos: 146 (84.9%)	92 (93.9%)	54 (73%)	0.0000	14.3596
	Negativos: 26 (15.1%)	6 (6.1%)	20 (27%)		
p53	Positivos: 38 (22.2%)	4 (4.1%)	34 (45.9%)	0.000	42.4794
	Negativos: 133 (77.8%)	93 (95.9%)	40 (54.1%)		
Ki 67	Positivos: 35 (26.5%)	12 (15.4%)	23 (42.6%)	0.000	12.1231
	Intermedios: 97 (73.5%)	66 (84.6%)	31 (57.4%)		
Cromogranina	Positivos: 105 (61.4%)	71 (71.7%)	34 (47.2%)	0.000	18.3178

	Negativos: 19 (11.1%)	3 (3%)	16 (22.2%)		
	Intermedios: 47 (27.5%)	25 (25.3%)	22 (30.6%)		
Sinaptofisina	Positivos: 118 (77.6%)	80 (88.9%)	38 (61.3%)	0.000	16.1488
	Negativos: 6 (3.9%)	2 (2.2%)	4 (6.5%)		
	Intermedios: 28 (18.4%)	8 (8.9%)	20 (32.3%)		
ALK	Positivos: 113 (68.5%)	79 (83.2%)	34 (48.6%)	0.000	24.9614
	Negativos 15 (9.1%)	2 (2.1%)	13 (18.6%)		
	Intermedios 37(22.4%)	14 (14.7%)	23 (32.9%)		
EZH2	Positivos: 151 (91%)	90 (95.7%)	61 (84.7%)	0.014	8.4693
	Negativos: 3 (1.8%)	2 (2.1%)	1 (1.4%)		
	Intermedios: 12 (7.2%)	2 (2.1%)	10(13.9%)		
PAX5	Positivos: 103 (60.2%)	74 (75.5%)	29(39.7%)	0.000	22.3656
	Negativos: 68 (39.8%)	58 (60.4%)	65 (89%)		
CD56	Positivos: 105 (62.1%)	64 (66.7%)	41 (56.2%)	0.025	7.3612
	Negativos: 25 (14.8%)	8 (8.3%)	17 (23.3%)		
	Intermedios: 39 (23.1%)	24 (25%)	15 (20.6%)		

Tabla 23. Marcadores propios del tumor y diferencias entre MCPyV positivos y negativos.

2. Marcadores del estroma:

Marcadores linfocitarios.

Respecto a la expresión de CD3, observamos que los casos MCPyV positivos mostraban un infiltrado rico en células CD3 en el 40.6%, un 30.2% eran CD3 negativos y un 29.2% eran CD3 intermedios. La expresión de CD3 en los casos MCPyV negativos era muy diferente, ya que la frecuencia de casos CD3 positivos era muy inferior (12.3%) y, sin embargo, los casos CD3 negativos e intermedios eran mucho más frecuentes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$)

En cuanto a la expresión de CD4, los casos MCPyV positivos mostraban infiltrado CD4 positivo en el 64.3% de los tumores, mientras que este marcador resultó negativo en el 35.7% de los casos. La frecuencia e intensidad de linfocitos CD4 positivos en los tumores MCPyV negativos era muy diferente, ya que un 40.5% de los casos mostraban positividad de CD4 en el infiltrado, mientras que un 59.5% eran CD4 negativos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.002$).

Observamos también que los tumores MCPyV positivos mostraban positividad de CD20 en el infiltrado en el 39.6% de los casos, frente a los 11% CD20 positivos en los tumores MCPyV negativos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

En cuanto a FOXP3, se observaba positividad con mucha mayor frecuencia en los casos MCPyV positivos (56.8%) que en los negativos (27.1%) y esta diferencia era estadísticamente significativa ($p=0.001$).

Los casos MCPyV positivos mostraban positividad para RORgamma en el 15.3% de los casos, frente a un 9.9% de positividad en los casos MCPyV negativos. Esta diferencia era estadísticamente significativa.

En cuanto a PD1, observamos que los casos MCPyV positivos mostraban positividad para este marcador en los linfocitos del estroma en el 55.9% de los casos, mientras que un 44.1% eran negativos. La expresión de PD1 en los casos MCPyV negativos era la inversa, con menos casos PD1 positivos que negativos, y esta diferencia era estadísticamente significativa.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de CD8.

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
CD3	Positivos: 48 (28.4%)	39 (40.6%)	9 (12.3%)	0.000	16.3329
	Negativos: 62 (36.7%)	29 (30.2%)	33 (45.2%)		
	Intermedios: 59 (34.9%)	28 (29.2%)	31 (42.5%)		
CD4	Positivos: 93 (54.1%)	63 (64.3%)	30 (40.5%)	0.002	9.5725
	Negativos: 79 (45.9%)	35 (25.7%)	44 (59.5%)		
CD20	Positivos: 46 (27.2%)	38 (39.6%)	8 (11%)	0.000	17.1511
	Negativos: 123 (72.8%)	58 (60.4%)	65 (89%)		
	Negativos: 68(39.8%)	24 (24.5%)	44 (60.3%)		
FOXP3	Positivos: 73 (44.2%)	54 (56.8%)	19 (27.1%)	0.001	14.4558
	Negativos				

	87 (52.7%)	39(41.1%)	48(68.6%)		
	Intermedios: 5 (3%)	2(2.1%)	3(4.3%)		
ROR gamma	Positivos: 22(13.1%)	15(15.5%)	7(9.9%)	0.04	6.4482
	Negativos: 142(84.5%)	82(84.5%)	60(84.5%)		
	Intermedios: 4(2.4%)	0 (0%)	4(2.4%)		
PD1	Positivos: 78(46.7%)	52(55.9%)	41(44.1%)	0.008	7.1481
	Negativos: 89(53.3%)	26(35.1%)	48(64.9%)		
CD8	Positivos: 108(63.9%)	67(69.8%)	29(30.2%)	0.068	3.3385
	Negativos: 61(36.1%)	29(30.2%)	32(43.8%)		

Tabla 24. Marcadores linfocitarios y diferencias entre los casos MCPyV positivos y MCPyV negativos.

Marcadores histiocitarios:

En la siguiente tabla se muestra la expresión de CD68, y como podemos observar la distribución de los valores positivos, negativos e intermedios fue diferente entre los casos MCPyV positivos y negativos y esta diferencia era estadísticamente significativa ($p=0.001$), ya que existía un 37.1% de los casos CD68 positivo en el grupo de los tumores MCPyV positivo frente a un 13.9% en los casos MCPyV negativos.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD163.

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
CD68	Positivos: 46(27.2%)	36(37.1%)	10(13.9%)	0.001	18.6228
	Negativos:				

	5(3%)	1 (1%)	4 (5.6%)		
	Intermedios: 118(69.8%)	60(61.9%)	58(80.9%)		
CD163	Positivos: 63(37.5%)	39(40.2%)	24(33.8%)	0.549	1.1992
	Intermedios 94 (55.9%)	53(54.6%)	41(57.8%)		
	Negativos: 11(6.6%)	5(5.2%)	6(8.5%)		

Tabla 25. Marcadores histiocitarios y expresión de MCPyV.

Marcadores de citotoxicidad: Granzima, perforina y TIA1

Estos tres marcadores mostraban mayor frecuencia de positividad en los casos MCPyV positivos que en los casos MCPyV negativos y en los tres marcadores esta diferencia era estadísticamente significativa.

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
Granzima	Positivos: 23 (13.6%)	18(18.6%)	5(6.9%)	0.000	15.2358
	Negativos: 77(45.6%)	32(33%)	45(62.5%)		
	Intermedios: 69(40.8%)	47(48.5%)	22(30.6%)		
Perforina	Positivos: 15 (14.9%)	13(22%)	2(4.8%)	0.014	8.5561
	Negativos: 83(82.2%)	43(72.9%)	40(95.2%)		
	Intermedios: 3(3%)	3(5.1%)	0 (0%)		
TIA1	Positivos 39(23.1%)	31(32%)	8(11.1%)	0.000	17.0447
	Negativos 39(23.1%)	13(13.4%)	26(36.1%)		
	Intermedios 91(53.9%)	53(54.6%)	38(52.8%)		

Tabla 26. Marcadores de citotoxicidad y expresión de MCPyV.

Marcadores de apoptosis: Caspasa 3 activa.

En la siguiente tabla se refleja la expresión de Caspasa 3 activa por parte de las células tumorales, y observamos que los casos MCPyV positivos mostraban positividad para Caspasa 3 activa en el 79.2% de los casos y un 20.8% mostraban positividad intermedia. La expresión de Caspasa 3 activa en los casos MCPyV negativos era muy diferente, ya que existía una proporción muy inferior de casos Caspasa 3 activa positivos y sin embargo encontramos un porcentaje de casos intermedios del doble (43.6%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
Caspasa 3	Positivos: 82(64.6%)	57(79.2%)	25(45.5%)	0.000	18.6228
	Negativos: 6(4.7%)	0 (0%)	6(10.9%)		
	Intermedios: 39(30.7%)	15(20.8%)	24(43.6%)		

Tabla 27. Marcadores de apoptosis y expresión de MCPyV.

Antígenos de histocompatibilidad:

Entre los tumores MCPyV positivos, un 13.7% eran HLA-I positivos, un 57.9% eran HLA-I negativos y un 28.4% eran HLA-I intermedios. La distribución de HLA-I en los casos MCPyV negativos era muy diferente, ya que un 42.5% eran HLA-I positivos, un 23.3% eran HLA-I negativos y un 3.3% eran HLA-I intermedios, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Parece pues que en los tumores MCPyV positivos existe una pérdida de expresión de HLA-I.

Con respecto a la expresión de HLA-II por parte de las células tumorales, no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
HLA I	Positivos: 44(26.2%)	13(13.7%)	31(42.5%)	0.000	25.0446
	Negativos: 72(42.9%)	55(57.9%)	17(23.3%)		
	Intermedios: 52(30.9%)	27(28.4%)	25(34.3%)		
HLA II	Positivos: 1(0.6%)	0(0%)	1 (1.4%)	0.353	2.0818
	Intermedios: 1 (0.6%)	1(1%)	0 (0%)		
	Negativos: 168 (98.8%)	96(99%)	72(98.8%)		

Tabla 28. Antígenos de Histocompatibilidad y expresión de MCPyV.

Regulación de la respuesta inmune:

La expresión de PDL1 en los macrófagos del estroma tumoral en los casos MCPyV positivos se observó en el 63.8% de los casos, mientras que en el 36.2% de los casos no existía expresión de este marcador. En contraste, la expresión de PDL1 en los casos MCPyV negativos era la inversa, ya que existían menos casos positivos que negativos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.001$). Parece pues que existe una relación directa entre la positividad de MCPyV y PDL1.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de PDL1 en las células neoplásicas del tumor.

VARIABLE	CASOS	MCPyV +	MCPyV -	p	Chi ²
PDL1 estroma	Positivos: 87(52.1%)	60(63.8%)	27(37%)	0.001	11.8641
	Negativos: 80(47.9%)	34(36.2%)	46(63%)		
PDL1 tumor	Positivos: 22(13%)	9(9.3%)	13(18.1%)	0.094	2.8117
	Negativos: 147(87%)	88(90.7%)	59(81.9%)		

Tabla 29. Marcadores de regulación de respuesta inmune y expresión de MCPyV.

c. Supervivencia ligada a tumor.

Con respecto a la positividad o negatividad de MCPyV en los tumores de nuestra serie, no encontramos diferencias significativas ($p=0.284$), siendo las curvas de supervivencia muy similares en ambos grupos.

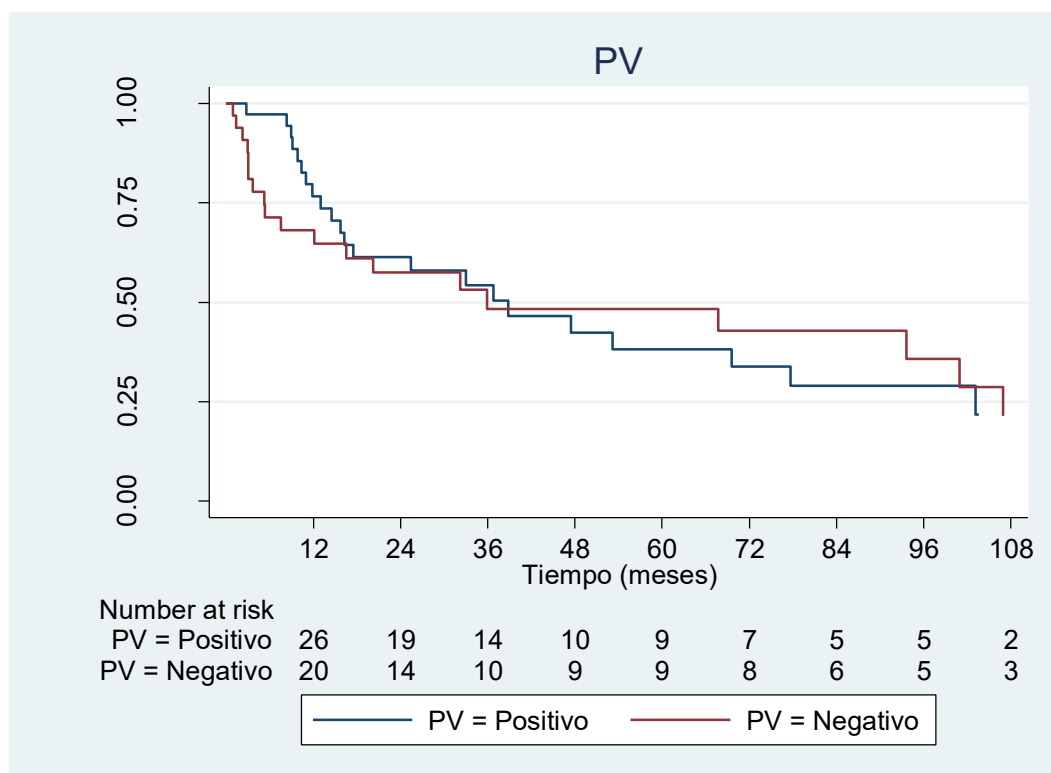


Fig. 37. Curva de Kaplan-Meier. Supervivencia de los casos MCPyV positivos y negativos.

5.3. REGRESIÓN HISTOPATOLÓGICA

De los 205 pacientes estudiados, 97 pacientes mostraban hallazgos de regresión histopatológica (47.3%), caracterizada por la presencia de dos o más de los siguientes criterios:

1. Infiltrado linfocitario
2. Colágeno esclerótico
3. Marcadores citotóxicos o de apoptosis positivos

Regresión histopatológica	Frecuencia	Porcentaje
No	108	52.7
Sí	97	47.3

Tabla 30. Regresión histopatológica. Distribución de los casos.



Fig. 38. Regresión histopatológica. Distribución de los casos.

Marcadores propios del tumor:

Los pacientes que no presentaban hallazgos histopatológicos de regresión mostraban mayor frecuencia de expresión de p53. En otras palabras, encontramos una tasa superior de casos p53 negativos en tumores con hallazgos de regresión histopatológica que en los que no la mostraban (84% y 70.9%, respectivamente). Esta diferencia fue estadísticamente significativa con un p valor de 0.035. En cuanto a la expresión EZH2 se diferenciaban en los valores intermedios, que eran más frecuentes en pacientes sin regresión (12.1%) que con ella (2.2%).

La diferencia más significativa se observó con PAX5, ya que los casos positivos se asociaban con mayor frecuencia a regresión histológica (71.1% frente a 45.4%)

En las siguientes tablas se muestran sólo los hallazgos estadísticamente significativos:

VARIABLE	CASOS	PRESENCIA DE REGRESIÓN	AUSENCIA DE REGRESIÓN	p	Chi ²
P53	Positivo: 40(22.2%)	15 (16%)	25 (29.1%)	0.035	4.4676
	Negativo: 140(77.8%)	79(84%)	61 (70.9%)		
PAX 5	Positivo: 10 (59%)	69(71.1%)	39 (45.4%)	0.000	12.5307
	Negativo: 75 (41%)	28 (28.9%)	47 (54.7%)		
EZH2	Positivo: 158 (90.8%)	86 (94.5%)	72 (86.8%)	0.027	7.2213

	Negativo: 4 (2.3%)	3 (3.3%)	1 (1.2%)		
	Intermedio: 12 (6.9%)	2 (2.2%)	10 (12.1%)		

Tabla 31. Variables estadísticamente significativas en cuanto a los marcadores propios del tumor y presencia de regresión.

Marcadores del estroma:

Marcadores linfocitarios:

Encontramos una relación directa entre la expresión de CD20, FOXP3 y PD1 y la presencia de hallazgos histopatológicos de regresión.

En cuanto a los casos FOXP3 positivos se asociaban también con una mayor frecuencia a regresión histológica (59.6% frente a 24.1%) y los casos sin regresión histopatológica tenían una mayor tasa de FOXP3 negativos.

En cuanto a CD20, los pacientes con regresión histopatológica presentaban también más positividad para CD20 que los que no presentaban regresión (42.4% frente a un 11.8%).

La regresión histopatológica mostraba también una relación directa con la expresión de PD1 (64.9% frente a un 24.4%).

VARIABLE	CASOS	PRESENCIA DE REGRESIÓN	AUSENCIA DE REGRESIÓN	p	Chi ²
CD20	Positivo: 49 (27.7%)	39 (42.4%)	10 (11.8%)	0.000	20.7001
	Negativo:				

	128(72.3%)	53 (57.6%)	75 (88.2%)		
FOXP3	Positivo: 76 (42.9%)	56 (59.6%)	20(24.1%)	0.000	25.9911
	Negativo: 92 (52%)	32 (34%)	60 (72.3%)		
	Intermedio: 9 (5.1%)	6 (6.4%)	3 (3.6%)		
PD1	Positivo: 81 (46%)	61(64.9%)	20(24.4%)	0.000	28.9220
	Negativo: 95 (54%)	33(35.1%)	62(75.6%)		

Tabla 32. Marcadores linfocitarios estadísticamente significativos y presencia de regresión.

Marcadores histiocitarios:

En cuanto a los marcadores histiocitarios, los pacientes con regresión histopatológica mostraban mayor frecuencia positividad para CD163 (54.6% frente a 19.3%) y CD68 (46.3% frente a 6%).

VARIABLE	CASOS	PRESENCIA DE REGRESIÓN	AUSENCIA DE REGRESIÓN	p	Chi ²
CD163	Positivo: 69(38.3%)	53(54.6%)	16(19.3%)	0.000	23.8759
	Negativo: 12(6.7%)	4 (4.1%)	8(9.6%)		
	Intermedio: 99(55%)	40(41.245)	59(71.1%)		
CD68	Positivo: 49(27.5%)	44(46.3%)	5(6%)	0.000	39.3137
	Intermedio: 124 (69.7%)	51(53.7%)	73(87.9%)		
	Negativo: 5(2.8%)	0(0%)	5(6%)		

Tabla 33. Marcadores histiocitarios y presencia de regresión.

Regulación de la respuesta inmune:

Observamos una relación directa entre la presencia de hallazgos histopatológicos de regresión y la positividad de PDL1 en las células del estroma (74.5% frente a un 28.1%)

VARIABLE	CASOS	PRESENCIA DE REGRESIÓN	AUSENCIA DE REGRESIÓN	p	Chi ²
PDL1 estroma	Positivo: 93(52.8%)	70(74.5%)	23(28.1%)	0.000	37.8696
	Negativo: 83(47.2%)	24(25.5%)	59(71.9%)		

Tabla 34. Marcadores de regulación de respuesta inmune y regresión.

En el análisis del resto de los marcadores estudiados no observamos diferencias estadísticamente significativas.

5. 4. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LA SUPERVIVENCIA LIGADA AL TUMOR

1. Supervivencia global

En nuestra serie, encontramos diferencias en la supervivencia global en relación con la edad del paciente, el estadio clínico y la expresión de CD163, ALK y EZH2. En las gráficas siguientes se muestra la supervivencia en relación con estas variables categóricas: Estadio, CD163, ALK y EZH2. Igualmente se incluye el p valor del test log-rank que nos permite comparar la curva de supervivencia por grupos.

Para el estadio el p valor fue < 0.001 lo que confirma la diferencia entre los diferentes estadios tumorales.

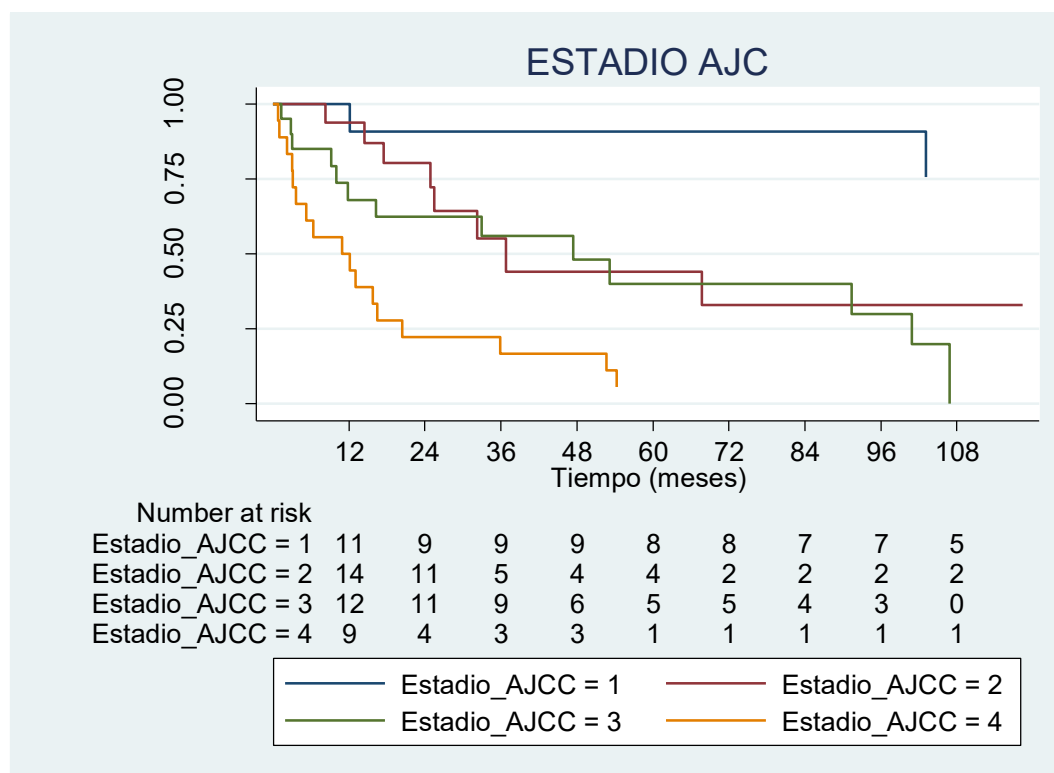


Fig. 39. Curvas de supervivencia en función del estadiaje (AJCC 8ª edición).

**** NOTA:**

Para el análisis de las supervivencias con respecto a los marcadores que presentaban positividad alta, intermedia o negativa se decidió agrupar los intermedios con los positivos, para poder establecer mejor las diferencias entre la presencia de un marcador (expresión alta o cualquier tipo de expresión del marcador) y su ausencia.

Los tumores con positividad intermedia o intensa de CD163 presentaban mejores tasas de supervivencia, con diferencia estadísticamente significativa (pvalor=0.010).

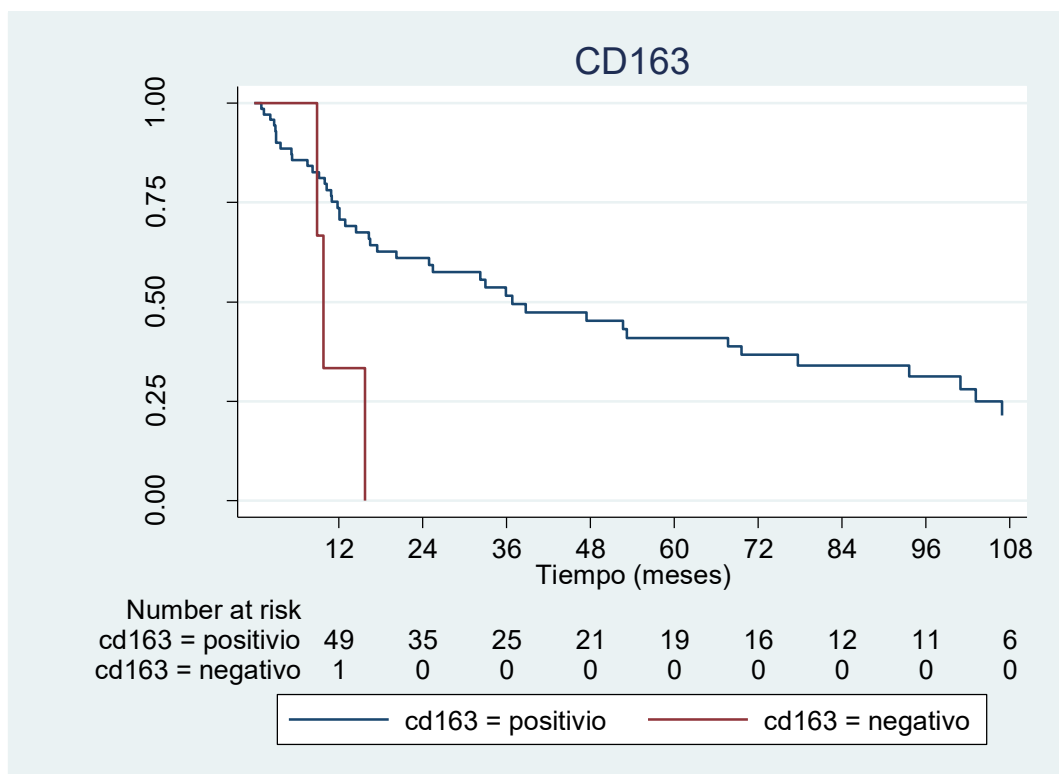


Fig. 40. Curva de supervivencia global en función de la expresión de CD163.

Con respecto a la expresión de ALK, encontramos también diferencias en la supervivencia ($p=0.034$), con mejor supervivencia en los casos ALK positivos, como se puede observar en el siguiente gráfico:

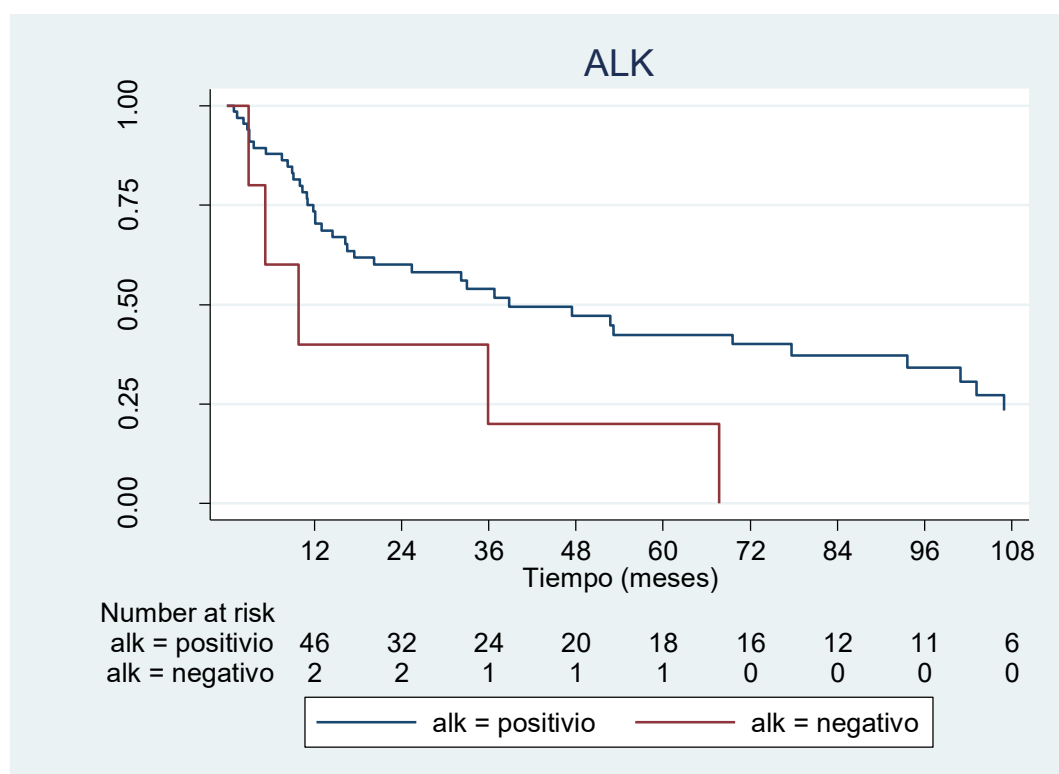


Fig. 41. Curvas de supervivencia global en función de la expresión de ALK.

En el caso de EZH2, el p valor del log Rank fue 0.0257. Los casos EZH2 negativo presentaban peor supervivencia. Como con los marcadores anteriores, estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

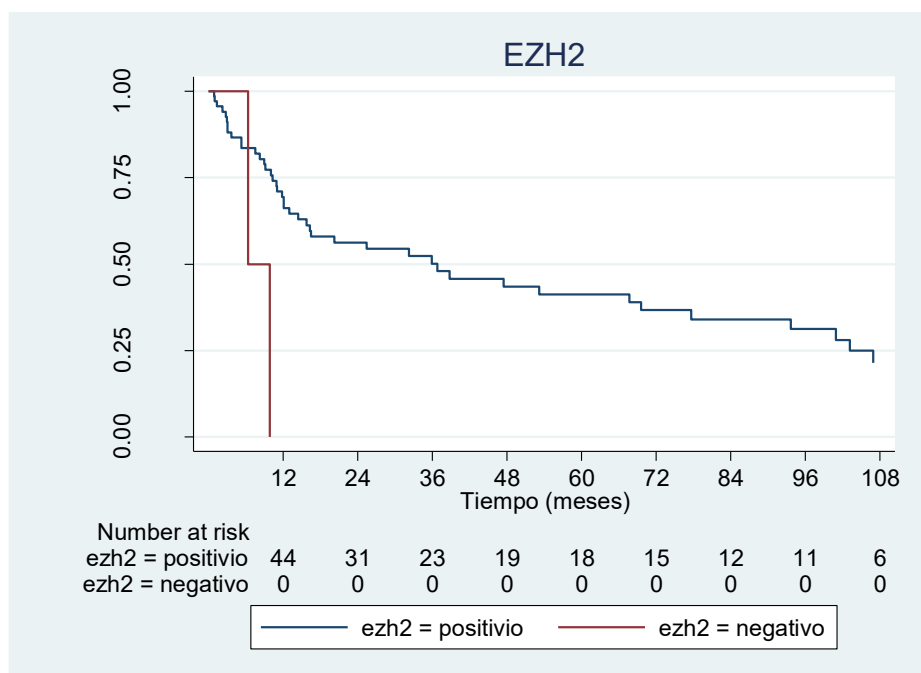


Fig 42. Curvas de supervivencia global en función de la expresión de EZH2.

En la siguiente tabla se muestra el *Hazard ratio* univariante para cada una de las variables significativas.

ANÁLISIS UNIVARIANTE				
Supervivencia global	HR	Intervalo Confianza		pvalor
		inferior	superior	
EDAD	1.03	1.01	1.06	0.039
Estadio_AJCC				
I				
II	4.71	1.21	17.99	0.023
III	7.12	1.85	27.33	0.004
IV	16.97	4.55	63.21	<0.001
CD163				
Positivo				
Negativo	3.85	1.14	12.99	0.030
ALK				
Positivo				
Negativo	2.66	1.03	6.83	0.042

Tabla 35. Análisis univariante de las variables estadísticamente significativas.

2. Supervivencia ligada al tumor

En cuanto a la supervivencia ligada al tumor, hemos encontrando diferencias estadísticamente significativas en relación con el estadio clínico, la expresión de CD4, CD163, TIA1, FOXP3, ALK y EZH2 y la presencia de necrosis.

A continuación, se muestran las gráficas de supervivencia en relación con todas estas variables categóricas. Además, se refleja el p valor del test log-rank que nos permite comparar la curva de supervivencia por grupos.

En supervivencia, está claro que los pacientes en estadio IV tienen una menor probabilidad de supervivencia en comparación con el resto de estadios, siendo la diferencia estadísticamente significativa (pvalor < 0.001).

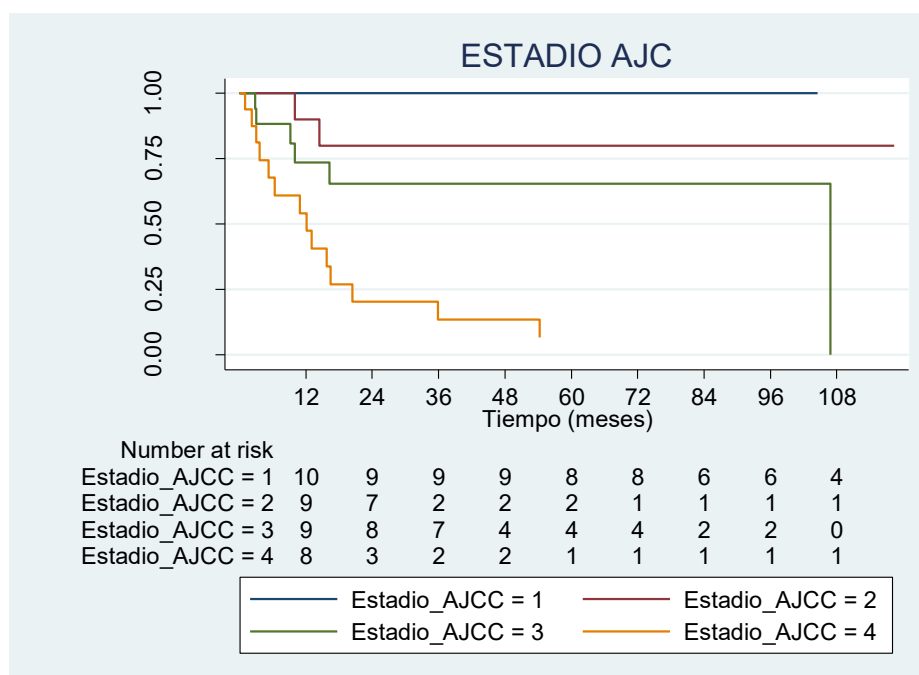


Fig. 43. Curvas de supervivencia ligada al tumor según estadio de la AJCC 8ª edición.

Con respecto a la positividad de PDL1 en el estroma, el p valor fue de 0.008, estadísticamente significativo, como se observa en el siguiente gráfico, con mejor supervivencia en los casos PD1 positivos.

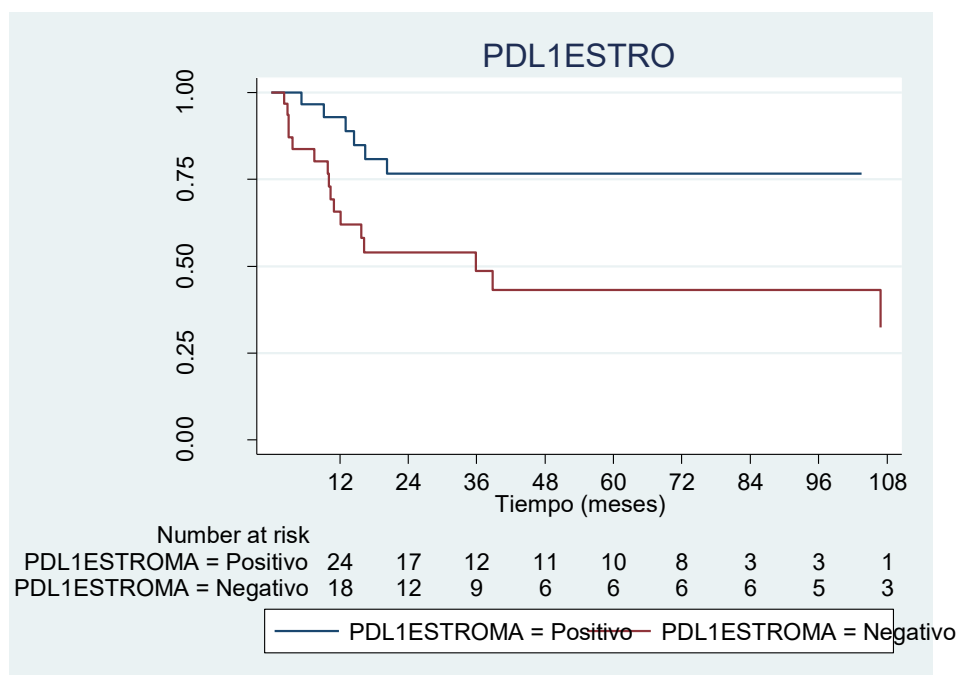


Fig. 44. Curvas de supervivencia ligada al tumor según la expresión de PD L1 en el estroma.

Para CD4 el p valor del logrank fue de 0.009, lo que confirma la diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia ligada al tumor, ya que la expresión de CD4 se asociaba con una mejor supervivencia.

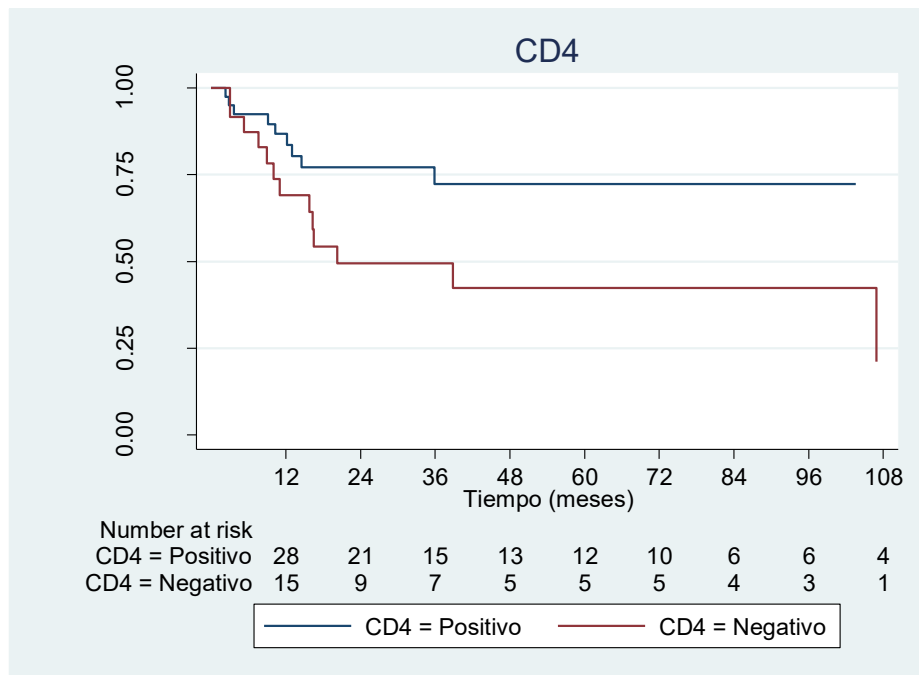


Fig. 45. Curvas de supervivencia ligada al tumor en función de la expresión de CD4.

Con respecto al CD163, el p valor fue de 0.003, confirmando también la diferencia estadísticamente significativa, con mejor supervivencia en los tumores con positividad para este marcador en el estroma.

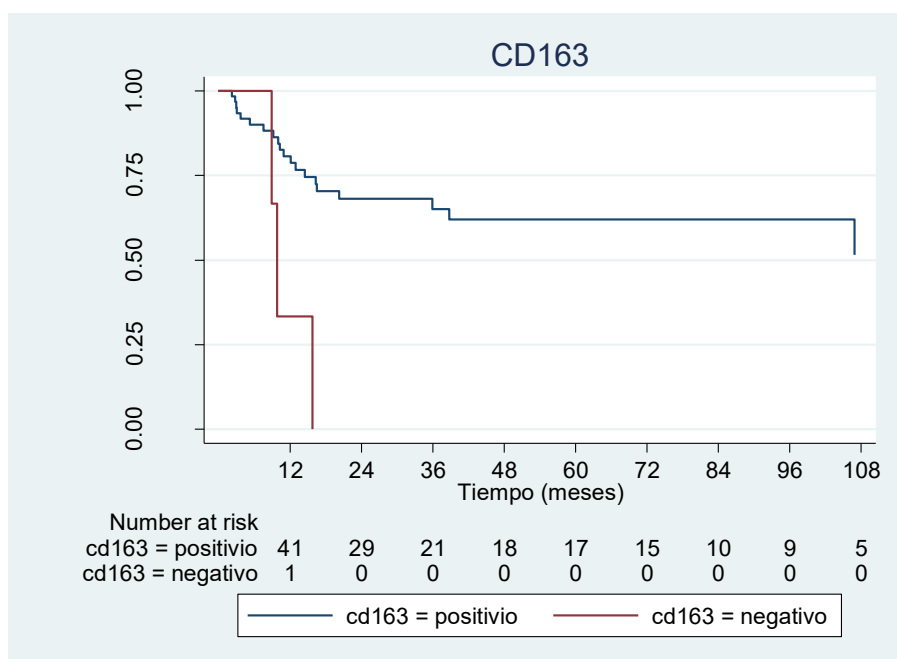


Fig. 46. Curva de supervivencia en función de la expresión de CD163.

Con respecto a la expresión de TIA1 en las células del estroma, el p valor fue de 0.005, con diferencias estadísticamente significativas, ya que se observó mejor supervivencia en los casos TIA1 positivos.

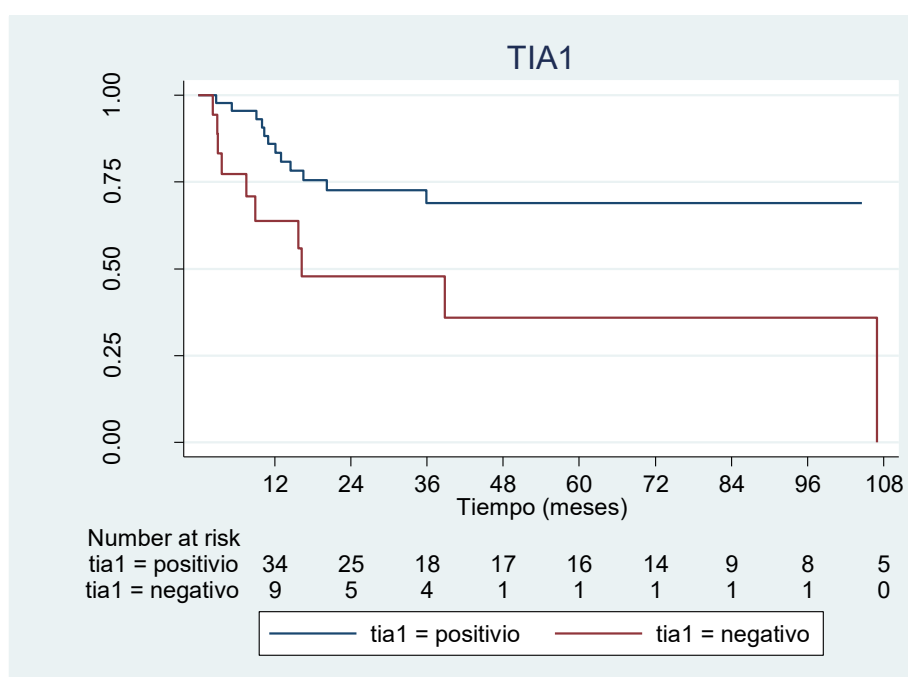


Fig 47. Curva de supervivencia según la expresión de TIA 1.

En FOXP3, el p valor fue de 0.0034, significativo. La presencia de células FOXP3 se asoció con supervivencia prolongada.

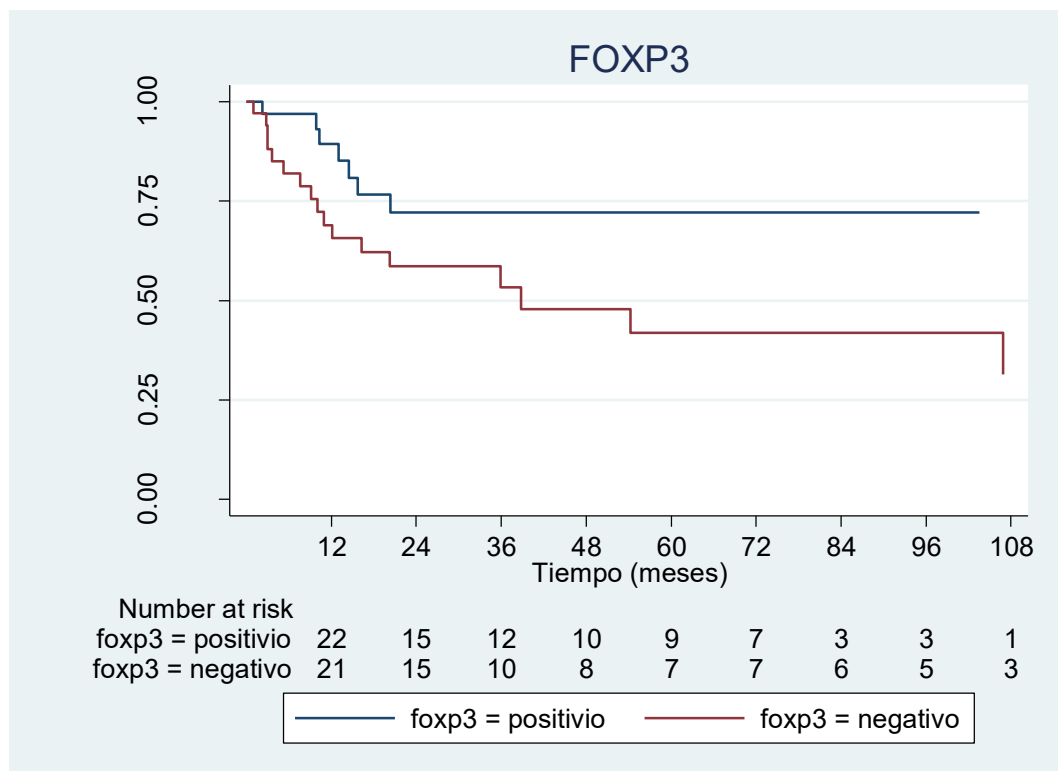


Fig. 48. Curvas de supervivencia ligada al tumor según la expresión de FOXP3.

La expresión de ALK también mostró significación estadística con un p valor inferior a 0.001 y mejor supervivencia en los casos que mostraban positividad de ALK.

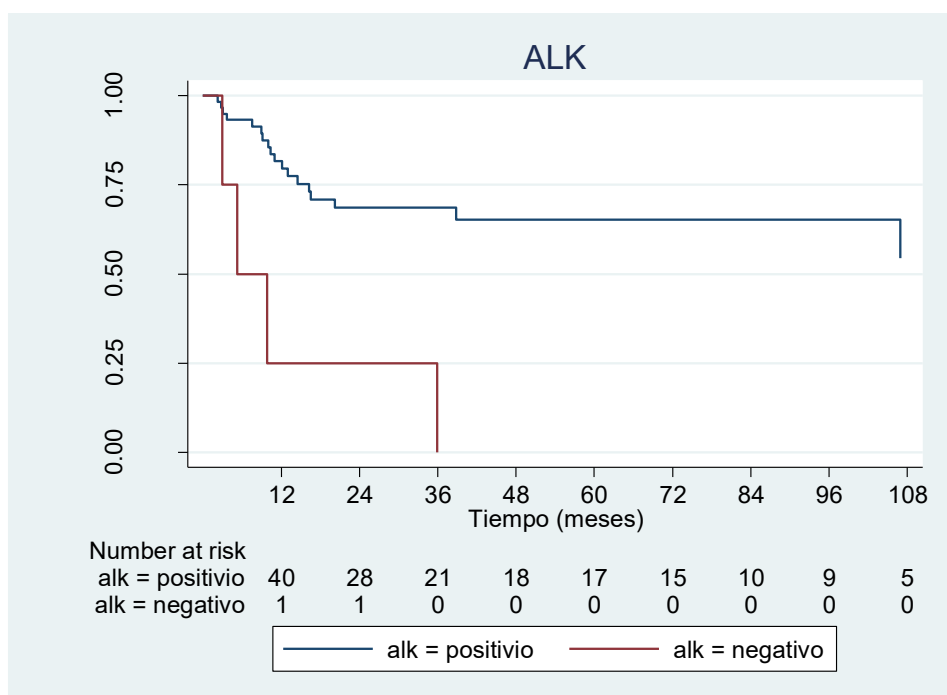


Fig. 49. Curvas de supervivencia ligada al tumor en función de la expresión de ALK.

Igualmente, la expresión de EZH2 tuvo un p valor de 0.005, con significación estadística en la supervivencia, ya que los casos que expresaban EZH2 presentaban mejores supervivencias.

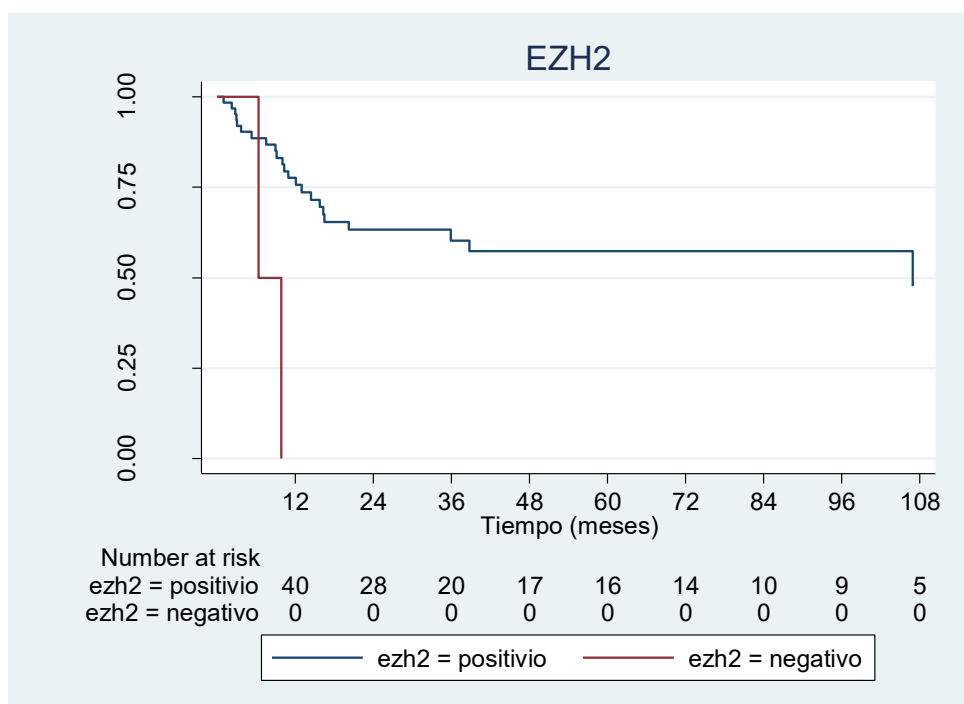


Fig. 50. Curvas de supervivencia en función de la expresión de EZH2.

Finalmente, la presencia de necrosis también mostró relación con la supervivencia con un p valor de 0.010, y los pacientes con tumores que mostraban áreas de necrosis presentaron peor pronóstico.

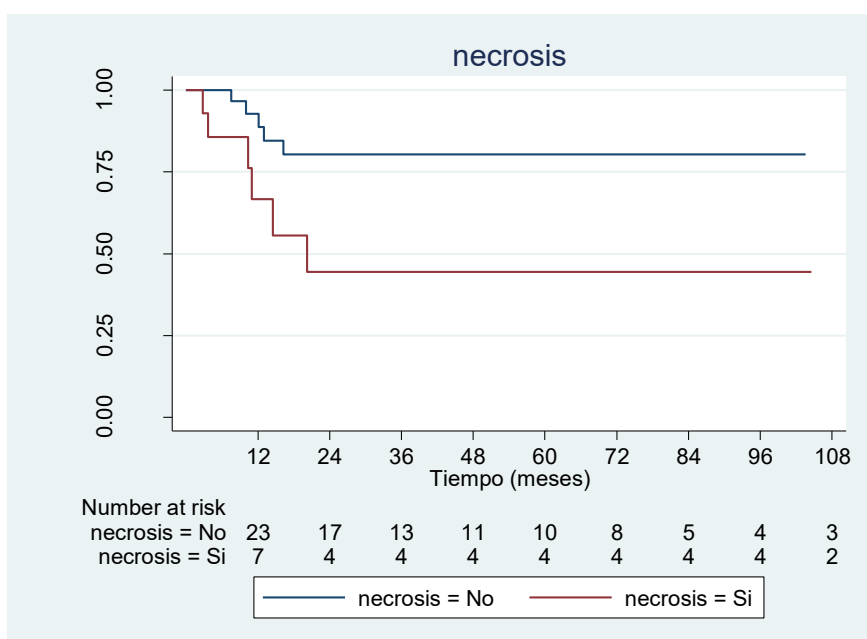


Fig. 51. Curvas de supervivencia en función de la presencia de necrosis.

En el siguiente gráfico se analiza la relación entre la regresión histopatológica y la supervivencia. No se observaron diferencias significativas en las curvas de supervivencia, el test de Wilcoxon/Breslow arrojó un p valor de 0.197. Sin embargo, la tendencia que se observa en la gráfica es de mejores supervivencias en los casos que presentaban signos de regresión.

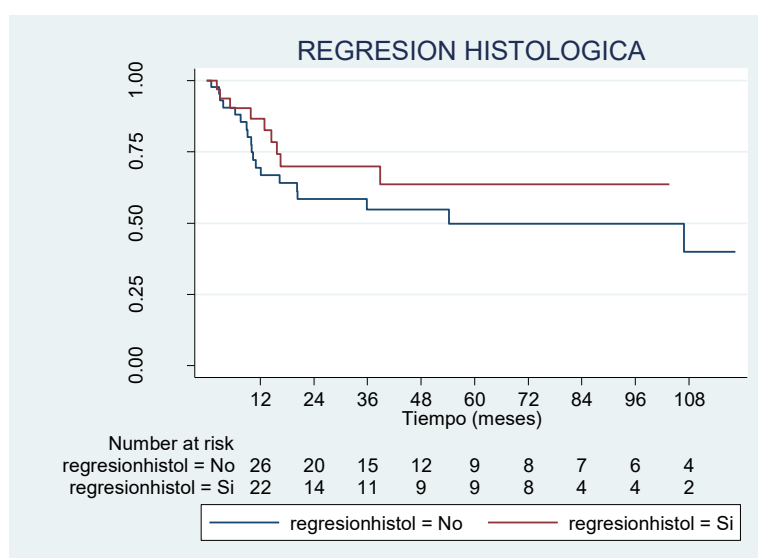


Fig. 52. Curvas de supervivencia en función de la regresión histopatológica.

Con respecto a la positividad o negatividad de MCPyV en el tumor, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la supervivencia (p valor = 0.648), siendo las curvas de supervivencia ligada a enfermedad muy similares en ambos grupos.

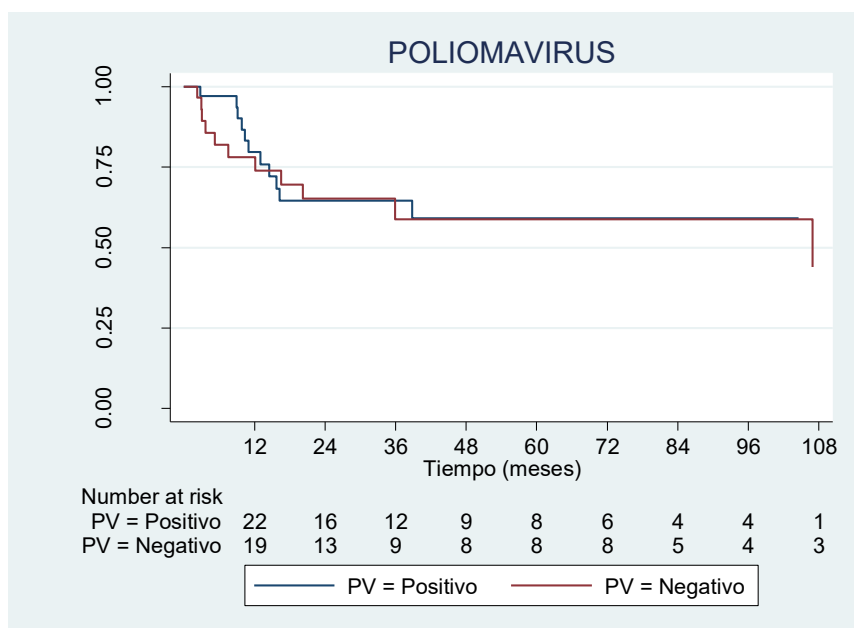


Fig. 53. Curvas de supervivencia ligada al tumor en función de la positividad para MCPyV.

La siguiente tabla muestra los riesgos (*Hazard Ratio*) de cada una de las variables significativas.

ANÁLISIS UNIVARIANTE				
Supervivencia tumor	HR	Intervalo Confianza		pvalor
		inferior	superior	
PDL1ESTRO				
No				
Sí	3.31	1.29	8.44	0.013
CD4				
Positivo				
Negativo	2.93	1.26	6.81	0.012
CD163				
Positivo				
Negativo	5.36	1.52	18.94	0.009
ALK				
Positivo				
Negativo	6.19	2.04	18.76	0.001
TIA1				
Positivo				
Negativo	5.35	1.16	24.56	0.031
Intermedio	1.96	0.43	8.88	0.382

FOXP3				
Positivo				
Negativo	2.50	0.99	6.29	0.052
EXH				
Positivo				
Negativo	6.61	1.43	30.45	0.001
Intermedio	1.38	0.38	4.98	0.622
Necrosis				
No				
Sí	4.06	1.27	12.92	0.017

Tabla 36. Análisis univariante de cada una de las variables significativas.

5. 5. SCORES Y NOMOGRAMA CON PROBABILIDAD DE SUPERIVENCIA

PRESENTANDO UNAS DETERMINADAS VARIABLES

A continuación, presentamos un nomograma en el que se representa la probabilidad de supervivencia global según el estadio y la edad.

A cada uno de los estadios y edades se les otorgó una puntuación o *score* (en eje de las ordenadas). Se sumaron los puntos obtenidos y posteriormente se representó la supervivencia a 24, 48 y 60 meses.

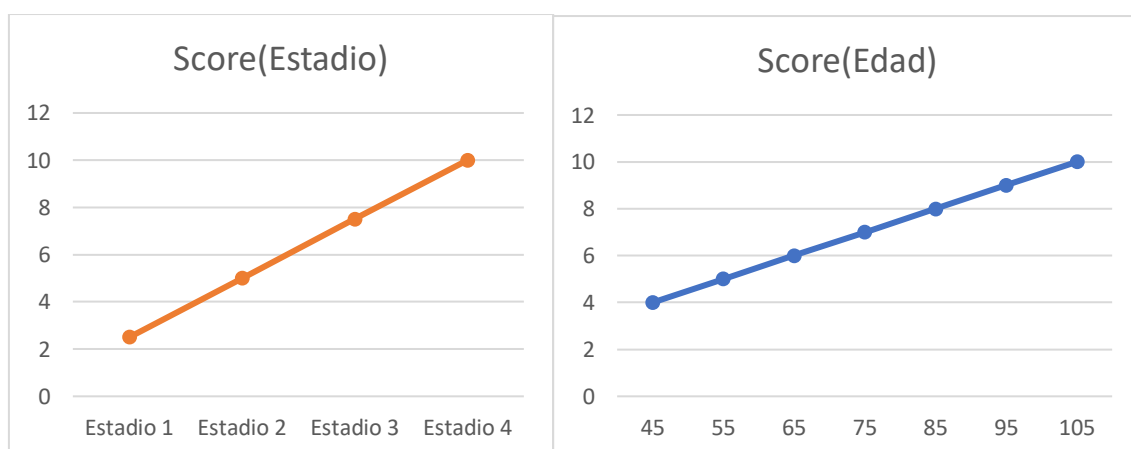


Fig. 54. Puntuación o “score” según el estadiaje y la edad. Score global = Score (estadio) + Score (edad).

En los siguientes gráficos se representa respectivamente la probabilidad de supervivencia a los 2, 4 y 5 años.

A los 2 años:

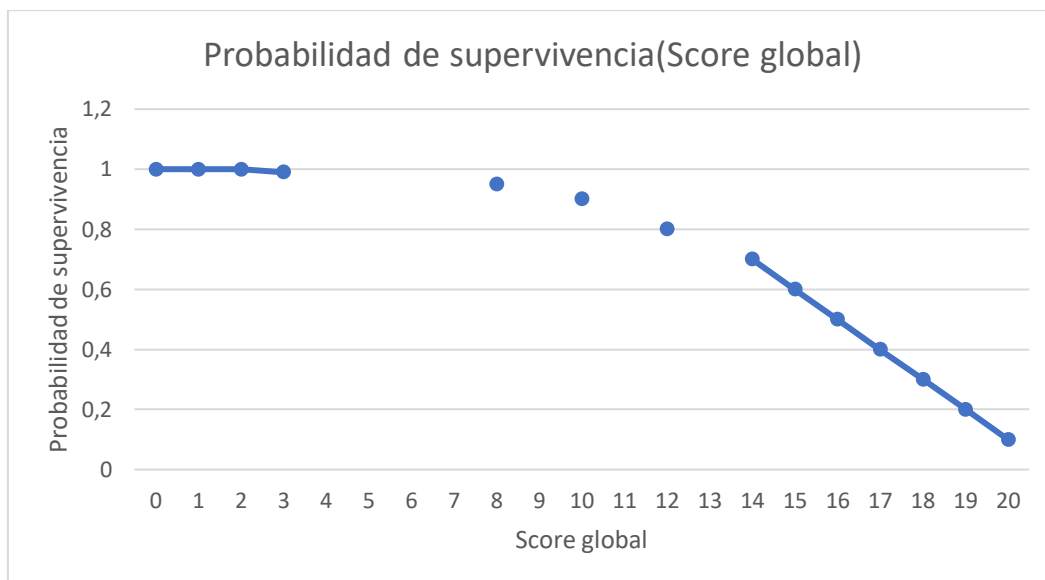


Fig. 55. Probabilidad de supervivencia a los 2 años (score global).

A los 4 años:

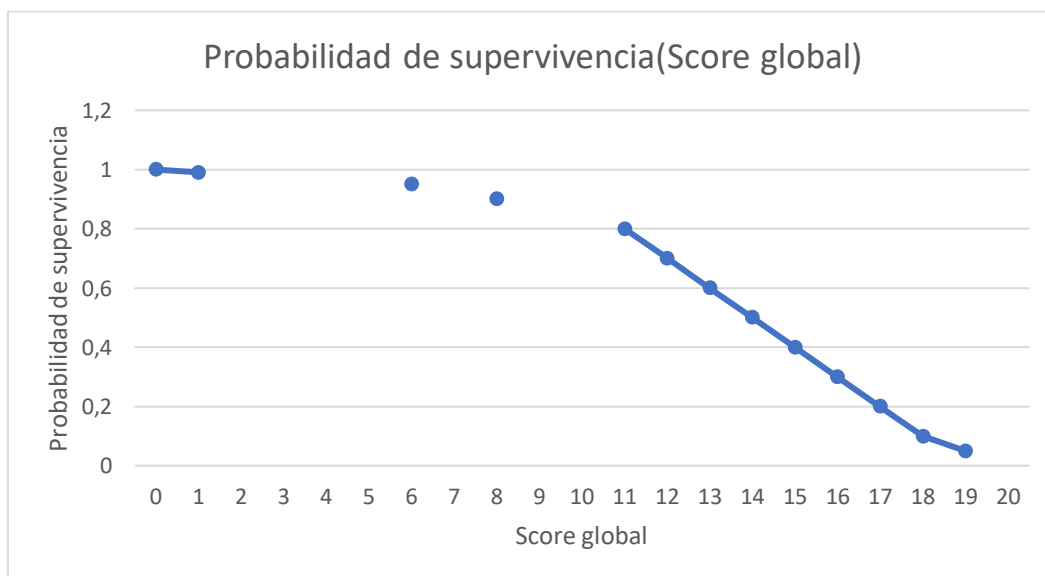


Fig. 56. Probabilidad de supervivencia global a los 4 años (score global).

A los 5 años:

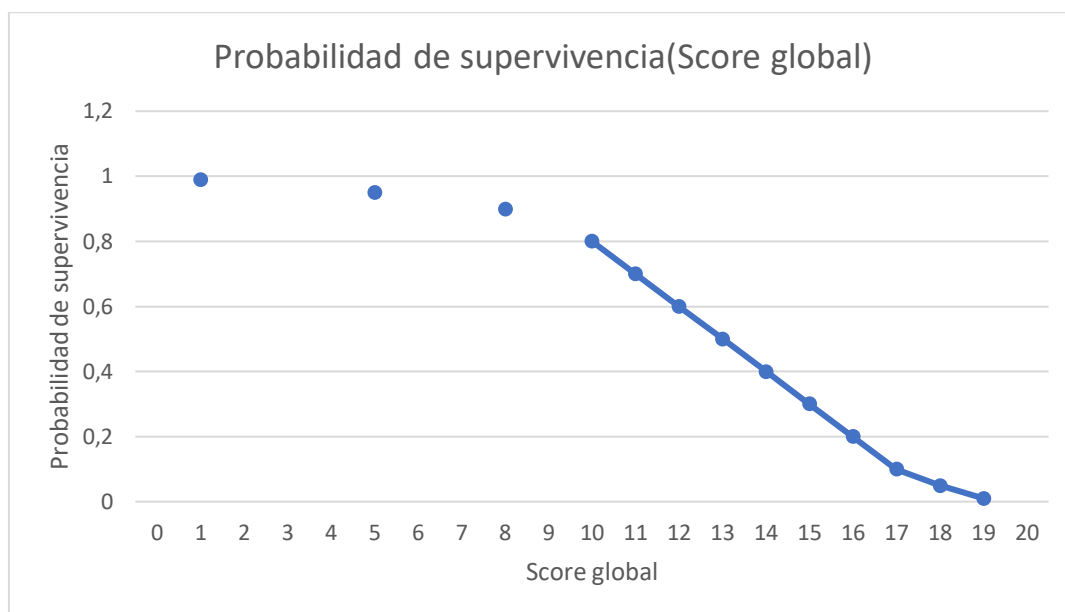


Fig. 57. Probabilidad de supervivencia global a los 5 años (score global).

Con respecto a la probabilidad de supervivencia ligada al tumor, a continuación, se muestra gráficamente la influencia de otras variables: ALK, TIA1 y CD163, esta vez con barras (primer) o líneas (segunda): Según la expresión positiva, intermedia o negativa se otorgó una puntuación o score en el eje de las ordenadas y según esa puntuación se observó en el score global la probabilidad de supervivencia ligada al tumor.

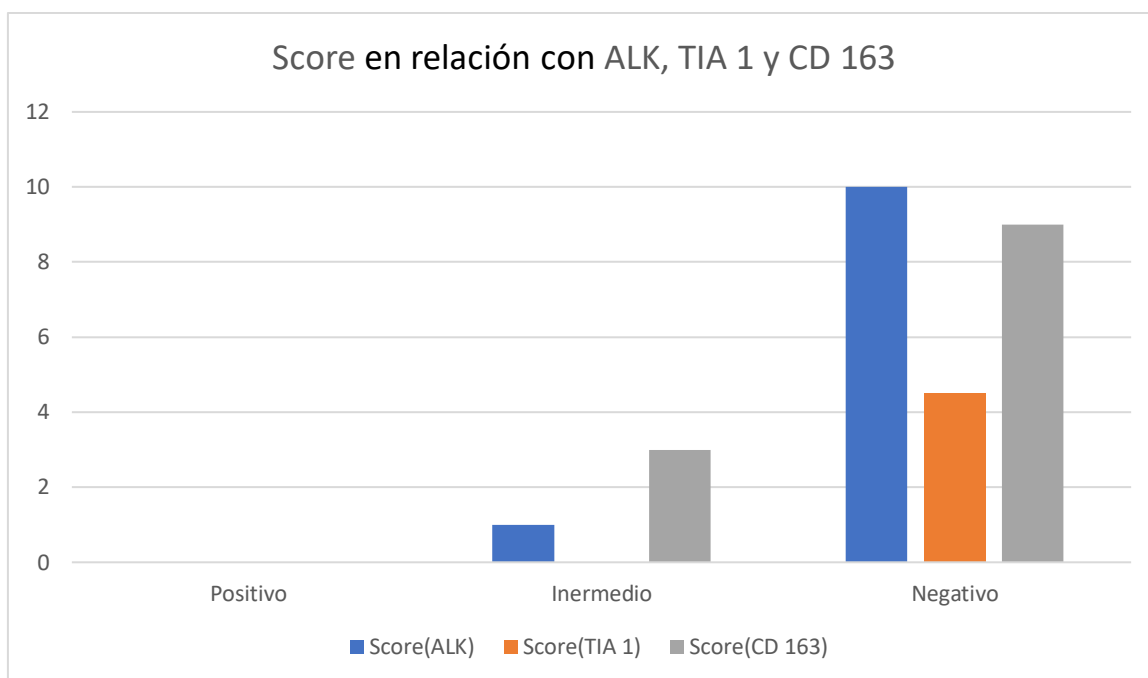


Fig. 58. "SCORE" en función de la expresión de ALK, TIA y CD163.

En el gráfico siguiente se representa mediante líneas la relación entre estas variables y la supervivencia

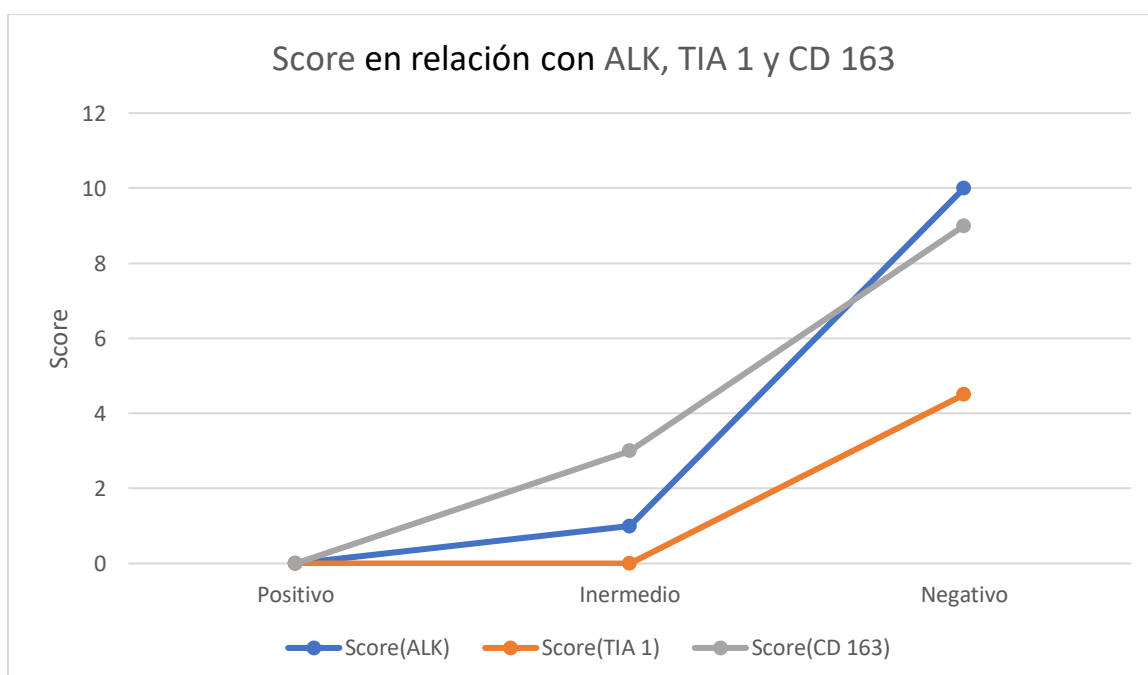


Fig. 59. "SCORE" en función de la expresión de ALK, TIA 1 y CD 163.

De nuevo, el score global se obtuvo sumando los scores de estas tres variables:

Score global = Score (ALK) + Score (TIA 1) + Score (CD 163).

A continuación, se representa la probabilidad de supervivencia en función del score global a los 2, 4 y 5 años, las 3 funciones juntas:

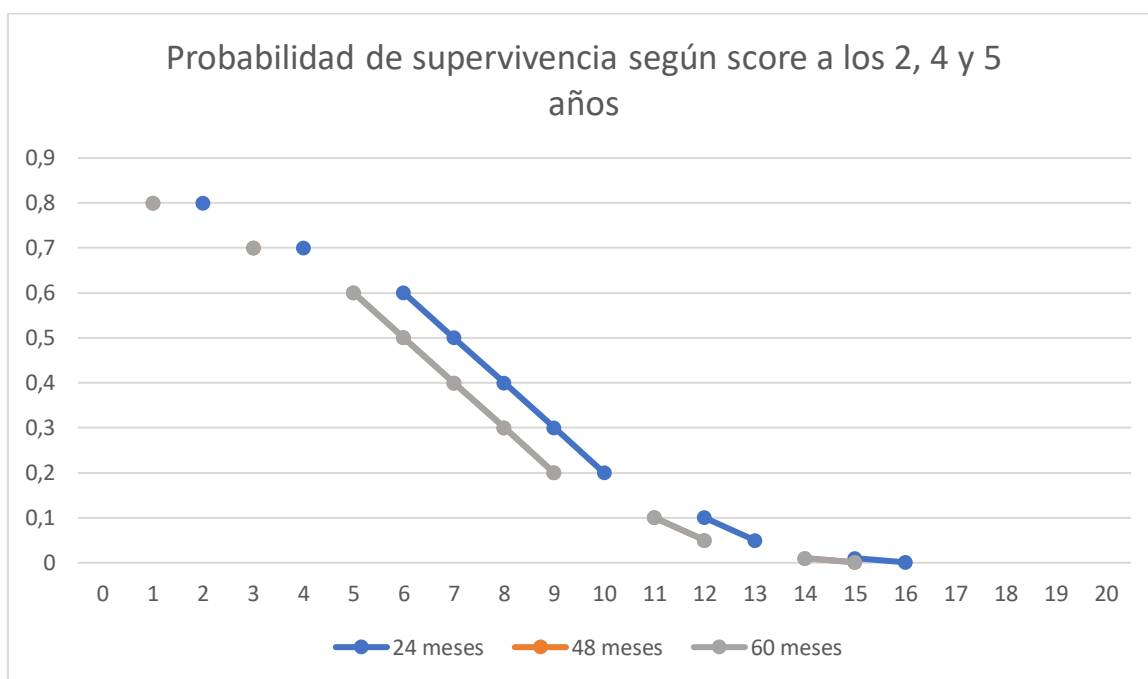


Fig. 60. Probabilidad de supervivencia a los 2, 4 y 5 años en función del "SCORE" global.

La línea roja no se ve (48 meses) porque se superpone con la verde (60 meses).

5.6. DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS DE CASOS SECUENCIADOS

Se secuenciaron dos casos con los siguientes hallazgos:

Caso A:

NF2: Exón 13: NM_000268.3: c.1387G>A; p.Glu463Lys. No se detectan fusiones ni CNVs en relación a las regiones estudiadas.

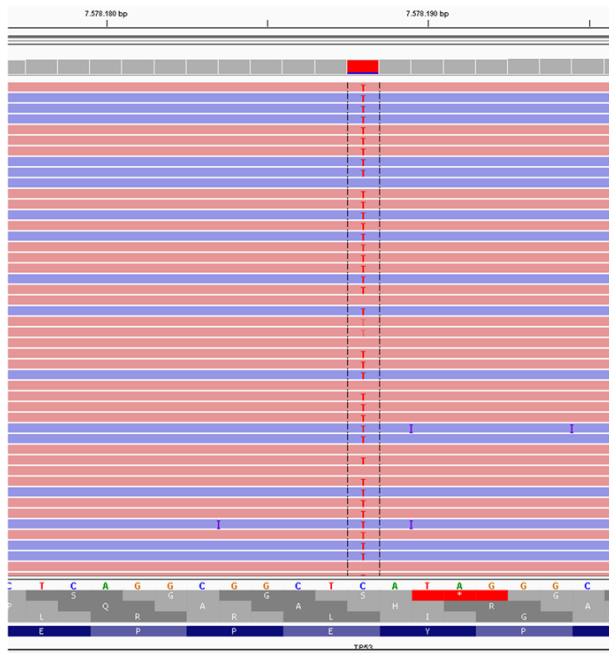
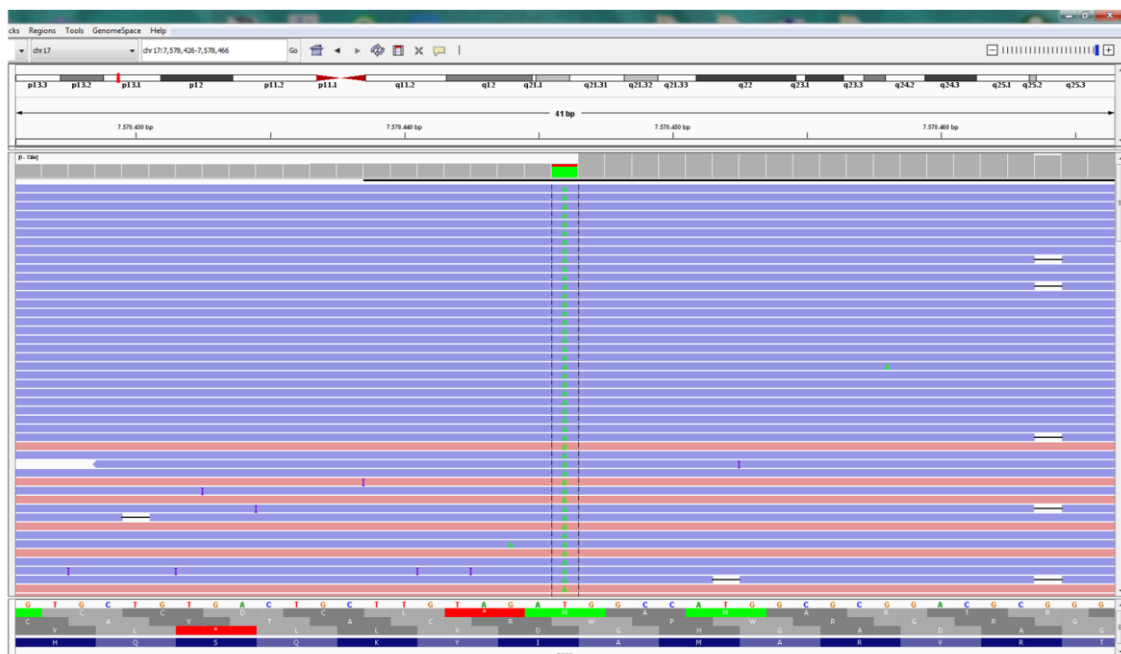


Fig. 61. Mutación de p53 en el exón 6. NM_000546.5; c.661G>A; p.Glu221Lys.

TP53:Exón 5: NM_000546.5; c.484A>T; p.Ile162Phe, VAF: 86,46%



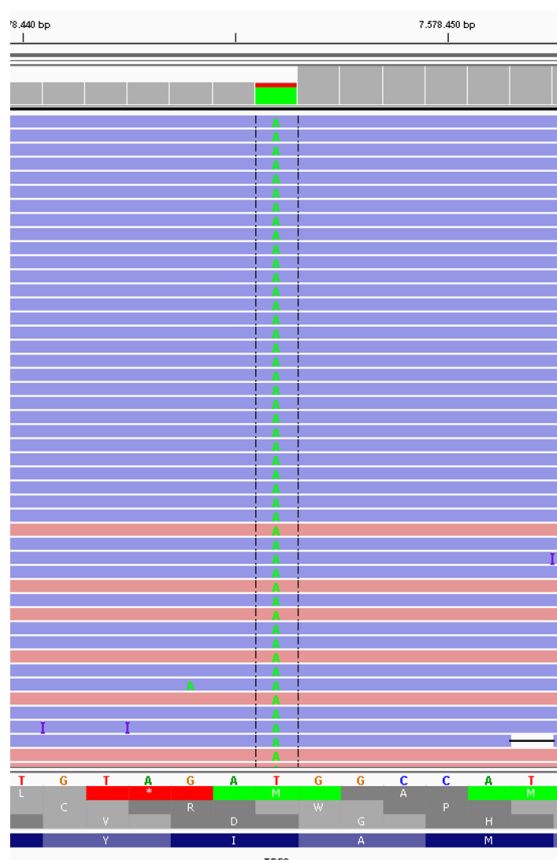


Fig. 62: Mutación de p53 en el exón 5. NM_000546.5; c.484A>T; p.Ile162Phe.

5. 7. RESUMEN DE RESULTADOS MÁS SIGNIFICATIVOS

1. Análisis descriptivo:

Pacientes con edad avanzada (78.6 años de media), la localización más frecuente fue cabeza y cuello. La distribución fue similar en los diferentes estadios.

2. Diferencias entre los MCPyV positivos y negativos:

En la siguiente tabla aparecen resumidas las características diferenciales de los casos MCPyV positivos frente a los MCPyV negativos:

MCPyV	Histopatología	Marcadores tumorales	Marcadores linfocitarios	Marcadores de macrófagos	Apoptosis
POS (+)	CCM puro	CK20 positivo Cromogranina ↑ Sinaptofisina ↑ ALK positivo EZH2 positivo HLA-I pérdida Pax-5 ↑	CD3 ↑ CD8 ↑ CD4 ↑ FOXP3 ↑ RORg ↑ PD1 ↑ TIA1 ↑ Granzima ↑ Perforina ↑ CD20 ↑	CD68 ↑	Casp 3 ↑
NEG (-)	Combinados Ulceración Elastosis	p53 ↑ Ki67 ↑			

Tabla 37. Resumen de las características diferenciales de los casos MCPyV positivos y MCPyV negativos.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos MCPyV positivos y negativos para todos los marcadores excepto CD8, PDL1 en el tumor, HLAII y CD163.

3. Diferencias entre los casos con regresión frente a los casos sin regresión: Los casos con regresión presentan más positividad de PAX5, FOXP3, CD20, PD1, PDL1, CD163, CD68. La positividad de p53 se relaciona con ausencia de regresión.

REGRESIÓN	Marcadores Tumorales	Marcadores linfocitarios	Macrófagos
SI	EZH2 PAX 5 pos	FOXP3 pos CD20 pos PD1 pos PDL1 pos	CD163 pos CD68 pos
NO	P53		

Tabla 38. Resumen de las características diferenciales de los casos con presencia o ausencia de regresión.

4. Supervivencia global:

Se observó una relación directa con la edad y el estadio. Cuanto mayor sea el estadio y la edad, peor es la supervivencia global. Además, se encontraron diferencias para CD163, ALK y EZH2. Se encontraron peores supervivencias si estos marcadores eran negativos.

5. Supervivencia ligada a tumor:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a estadio clínico, CD4, CD163, TIA1, FOXP3, ALK, EZH2 y necrosis, con una mejor supervivencia en relación con la positividad de CD4, CD163, TIA1, FOXP3, ALK y EZH2 y peor supervivencia cuando existía necrosis en los islotes tumorales.

MEJOR SUPERVIVENCIA	PEOR SUPERVIVENCIA
ALK EZH2 CD4 FOXP3 TIA1 CD163	Edad Estadio Necrosis

Tabla 39. Variables que se relacionaron con mejores y peores supervivencias.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este estudio, realizado sobre la mayor serie europea de pacientes con CCM (205 casos), demuestra que los casos MCPyV positivos y negativos difieren en el fenotipo del tumor y también en el tipo de estroma. Además, nuestro estudio demuestra que la presencia de hallazgos histopatológicos de regresión tumoral, así como de otros parámetros, tanto del tumor como del estroma, están relacionados con la supervivencia.

Esta serie es similar en cuanto a las características clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas a otras series descritas en la literatura (3,99).

Con respecto a la edad, en el momento del diagnóstico es similar a la media, publicada en la literatura, que se estima entre los 75 y 80 años. En nuestro estudio la edad media fue de 78.6 años.

El sexo predominante en nuestro estudio fue el sexo femenino (59%). La mayoría de los trabajos muestran una frecuencia mayor en el sexo masculino, excepto dos series de Finlandia y China (79,100,101), donde como en nuestro estudio hay predominio del sexo femenino. En cuanto a la localización más frecuente también es similar a lo descrito en otras series, con predominio de cabeza y cuello (102).

El porcentaje de inmunosuprimidos fue de un 18% y en las series previamente estudiadas oscilaba entre un 10-15% (20).

En nuestra serie encontramos una frecuencia de 14.5% de CCM combinados, todos ellos MCPyV negativos, hallazgo similar a lo descrito en otros trabajos publicados en la literatura (44,103), cuyo porcentaje variaba entre un 5% y un

18%. Las características clínicas y demográficas en el momento del diagnóstico de estos CCM combinados son similares a las del CCM clásico (44). Se ha descrito que estos tumores combinados tienen mayor agresividad que las formas puras y presentan con mayor frecuencia negatividad para MCPyV (44). Sin embargo, en un trabajo reciente de Kervarrec et al. (43) esta negatividad de MCPyV más frecuente en los casos combinados ha quedado en entredicho, ya que estos autores encontraron que 4 de sus 8 casos de CCM combinado eran positivos para MCPyV. En nuestra serie, como en otros trabajos previos publicados, todos los CCM combinados eran negativos para MCPyV, lo que apoya la idea de que estos casos están inducidos por la radiación UV y las mutaciones derivadas de ésta (103,104).

La diferenciación aberrante o divergente es infrecuente y se ha documentado sólo en casos aislados y series cortas. Se han descrito casos de carcinoma de Merkel con diferenciación ecrina, escamosa, rabdomioblástica, sarcomatosa, leiomiosarcomatosa y neuroblástica. En nuestra serie no hemos encontrado casos de CCM con estos tipos de diferenciación aberrante, por lo que no podemos compararlos con los casos previamente descritos.

En cuanto al epidermotropismo, en nuestra serie encontramos este hallazgo en el 3.39 % de los casos, con una menor frecuencia que en otras series publicadas (38)(105,106), D'Angostino et al. (106) encontraron 6 casos epidermotropos de un total de 40 casos analizados, con 3 de estos tumores localizados en el párpado.

Para asegurar la calidad y robustez de nuestros resultados, nuestro estudio ha seguido una metodología que creemos ha sido muy rigurosa y que hemos especificado en el apartado de “material y métodos”.

6.1. Expresión de ALK en las células tumorales del CCM

La expresión de ALK en CCM ha sido escasamente investigada en estudios previos, ya que sólo existen tres trabajos publicados al respecto (73,107,108). Filtenborg-Barnkob et al. (73) estudiaron 32 casos de CCM y 12 carcinomas microcíticos de pulmón y realizaron la inmunotinción con ALK1, D5F3 y 5 A4. Con el anticuerpo D5F3, el 92% de los CCM eran positivos para ALK y solamente un 8% de los carcinomas microcíticos de pulmón resultaron positivos para este marcador. En otros trabajos recientemente publicados por Veija et al. (107,108) encontraron positividad en un 51% de los CCM y relacionaron esta positividad con el MCPyV. En nuestra serie hemos encontrado una positividad del 90.01 %, similar al trabajo de Filtenborg-Barnkob et al. (73) (68.48% con una positividad intensa y 22.42% con una positividad intermedia). Además, hemos encontrado una relación directa entre ALK y MCPyV, ya que los casos ALK positivos expresaban con mayor frecuencia MCPyV. Finalmente, en nuestra serie, hemos encontrado una mayor supervivencia en los casos ALK positivos que en los casos ALK negativos, y no hemos encontrado en la literatura referencias previas en este sentido.

6.2. Expresión de EZH2 en las células tumorales del CCM

En cuanto a EZH2, hemos encontrado expresión de este marcador en un 97.7% de los casos, porcentaje algo mayor que en las series previamente descritas (107,109) .

Además, hemos encontrado mejoría en la supervivencia de los pacientes que expresaban EZH2, hallazgo que no concuerda con lo descrito por Harms et al. (109), que lo relacionaron con peores supervivencias. Estos autores propusieron que el EZH2 puede actuar como oncogén en los casos con expresión elevada y proponen realizar ensayos para probar inhibidores de EZH2 como posibilidad terapéutica. Entre las limitaciones de su estudio Harms et al. (109) señalaron que se trataba de una serie corta de casos (71 pacientes) y la mayoría de sus pacientes estaban en estadio III. En nuestro estudio la serie de casos es mayor, pero encontramos muy pocos casos EZH2 negativos, lo que puede ser un factor de confusión a la hora de estudiar la supervivencia en esta n tan pequeña.

6.3. Expresión de TP53 en las células tumorales del CCM

La expresión de p53 en nuestro estudio fue similar a la de series previas, con un 22.22% de los casos y se asociaba de manera inversa con MCPyV. No hemos encontrado ninguna relación con la supervivencia ni global ni asociada a tumor, hallazgo que es similar al de algunas series publicadas (110).

6.4. Expresión de PAX5 en las células tumorales del CCM

En cuanto al porcentaje de positividad de PAX 5 en CCM varia ampliamente entre las series previamente publicadas en la literatura, desde el 22% en unas

series (111) hasta el 100% en otras (112) . Quizá esta disparidad de resultados se deba a los diferentes clones de anticuerpos utilizados en los distintos estudios. Los porcentajes de positividad son menores con el clon SP34, mientras que los estudios con positivities mucho más altas utilizaron el clon Dax-Pax 5, que es el clon utilizado en nuestra serie. En nuestro trabajo, encontramos positividad para PAX5 en un 59 % de los casos. En el trabajo de Johansson et al. (111) relacionaron la expresión de PAX5 con positividad para MCPyV y no encontraron diferencias en el pronóstico entre los casos positivos y negativos, como ocurre en nuestra serie. En nuestro trabajo encontramos también una relación estadísticamente significativa entre la positividad de PAX5 y positividad para MCPyV.

6.5. Expresión de PDL1 Y PD 1 en CCM

Algunos autores (97) han analizado la relación entre la expresión de PD1 y PDL1 y la relación que existe entre la expresión de ambos marcadores y la respuesta a inmunoterapia. Estos autores describieron que los tumores que respondieron mejor a fármacos anti-PD1 tenían mayor densidad de células PD1 y PDL1 positivas, comparado con los no respondedores. No encontraron diferencias en cuanto a la densidad de células CD8+ y la respuesta clínica. Por ello, concluyeron que, aunque la presencia o ausencia de expresión de PDL1 no es suficiente para predecir la respuesta a los anti-PD1 en CCM, la densidad de las células PD1 y PDL1 positivas y las interacciones geográficas se pueden correlacionar con la respuesta clínica.

6.6. Determinación de la expresión de MCPyV:

En nuestra serie, los estudios inmunohistoquímicos para la demostración de la presencia o ausencia de MCPyV se llevaron a cabo con el anticuerpo monoclonal CM2B4, que es el anticuerpo utilizado de referencia por otros investigadores (60), mostrando un 88% de sensibilidad y un 94% de especificidad comparado con el uso combinado de IHQ y PCR (26).

Hasta la fecha, no existe un método estandarizado para determinar el estado viral del tumor, ni un consenso formal de cuál es el método más adecuado para aplicar en el diagnóstico histopatológico habitual, aunque en la práctica habitual se utiliza de forma casi generalizada el anticuerpo CM2B4. Nuestra elección se basó en resultados previos parcialmente publicados por González-Vela et al., (113) comparando PCR e IHQ que mostraron mayor sensibilidad y especificidad con la IHQ; así como en los resultados de Moshiri et al. (26) que no encontraron diferencias significativas utilizando IHQ o la combinación de IHQ y PCR en su serie. Más específicamente, Moshiri et al. (26) observaron que la PCR mostraba positivities más altas que la inmunohistoquímica utilizada de forma aislada, aunque existía una gran heterogeneidad en cuanto a las técnicas utilizadas, así como en cuanto al rango en el cual se consideraba una PCR positiva. En ese estudio, realizado en 282 pacientes diagnosticados de CCM, encontraron que la PCR tenía una sensibilidad del 82.5% y una especificidad de un 81.1 %, mientras que la IHQ mostraba una sensibilidad del 88.2% y una especificidad del 94.3%. Las PCR utilizadas para la detección del MCPyV varían en cuanto a las secuencias utilizadas para detectar el virus, el número de copias del virus y la

secuencia que se toma de referencia para considerar este test positivo. Moshiri et al. (26) detectaron 40 falsos negativos por PCR en su estudio (que resultaron ser positivos mediante inmunohistoquímica), y también observaron casos con PCR positiva para MCPyV que no eran CCM (3/16 casos), hallazgo que no se produce utilizando técnicas IHQs.

Además, algunos estudios de PCR han detectado positividad para MCPyV en carcinomas neuroendocrinos pulmonares de célula mediana y pequeña, mientras que los estudios inmunohistoquímicos no han demostrado esta positividad en casos de carcinoma de pulmón, por lo que se considera que la IHQ utilizando el anticuerpo CM2B4 es la técnica más específica (114).

Existen al menos otros cuatro estudios publicados (104,115–117) que han utilizado la IHQ y la PCR para detectar MCPyV en casos de CCM. En esos cuatro estudios se detectaron más casos positivos por PCR que por IHQ, y los autores sugirieron que la PCR era más sensible que la IHQ. Sin embargo, son series más cortas, con resultados dispares que no analizaron el problema de los falsos positivos de la PCR, por lo que actualmente no hay consenso respecto a cuál es la técnica de PCR mejor, más fiable y reproducible para detectar la presencia de MCPyV en CCM.

Como consecuencia de estos resultados dispares con PCR, en el consenso de expertos SCOPE, se ha propuesto el estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo CM2B4 como técnica de referencia para incluir en el informe histopatológico de los casos de CCM.

La frecuencia de positividad para MCPyV en CCM varía entre las diferentes series, dependiendo de la localización geográfica y de la técnica empleada. En nuestra serie encontramos positividad en el 57% de los casos. En el estudio original de Feng et al. (23) detectaron MCPyV en un 80% de los casos. Las positividades de MCPyV en MCC entre diferentes trabajos varía entre el 24% y el 100% (117,118). Los 10 estudios con mayor número de pacientes estiman la positividad del poliomavirus entre un 46% y un 89%, con un porcentaje estimado de todos los trabajos de un 76% (453 de 595 casos) (23,81,116,118–125). Una posible explicación de esta tasa relativamente baja de casos positivos para MCPyV es la procedencia de los casos. En una población como la española con una exposición alta a radiación ultravioleta puede ser que muchos casos de CCM se deban a las mutaciones producidas por la radiación ultravioleta y no a la presencia del virus. Por otra parte, recientemente en un estudio de Kervarrec et al. (126) encontraron que en su serie de casos europeos y utilizando inmunohistoquímica con el anticuerpo CM2B4 existía positividad en el 64% de los casos, porcentaje similar al de nuestra serie, frente a un 83% medido por PCR a tiempo real.

6.7. Diferencias entre CCM MCPyV positivos y negativos:

Los resultados de este trabajo muestran que los CCM MCPyV positivos y negativos son dos entidades diferentes a nivel genómico, inmunohistoquímico y biológico.

La comparación entre casos MCPyV positivos y negativos demostró la presencia de diferencias estadísticamente significativas para todos los marcadores analizados excepto en la cantidad de células CD8, expresión de PDL1 en el

tumor, expresión de HLA-II por el tumor y presencia de macrófagos CD163-positivos. Estas diferencias aparecen resumidas en la tabla y figuras siguientes:

MCPyV	Histopatología	Marcadores tumorales	Marcadores linfocitarios	Marcadores de macrófagos	Apoptosis
POS (+)	CCM puro	CK20 positivo Cromogranina ↑ Sinaptofisina ↑ ALK positivo EZH2 positivo HLA-I pérdida Pax-5 ↑	CD3 ↑ CD8 ↑ CD4 ↑ FOXP3 ↑ RORg ↑ PD1 ↑ TIA1 ↑ Granzima ↑ Perforina ↑ CD20 ↑	CD68 ↑	Casp 3 ↑
NEG (-)	Combinados Ulceración Elastosis	p53 ↑ Ki67 ↑			

Tabla 40. Resumen de las características diferenciales de los casos MCPyV positivos y MCPyV negativos.

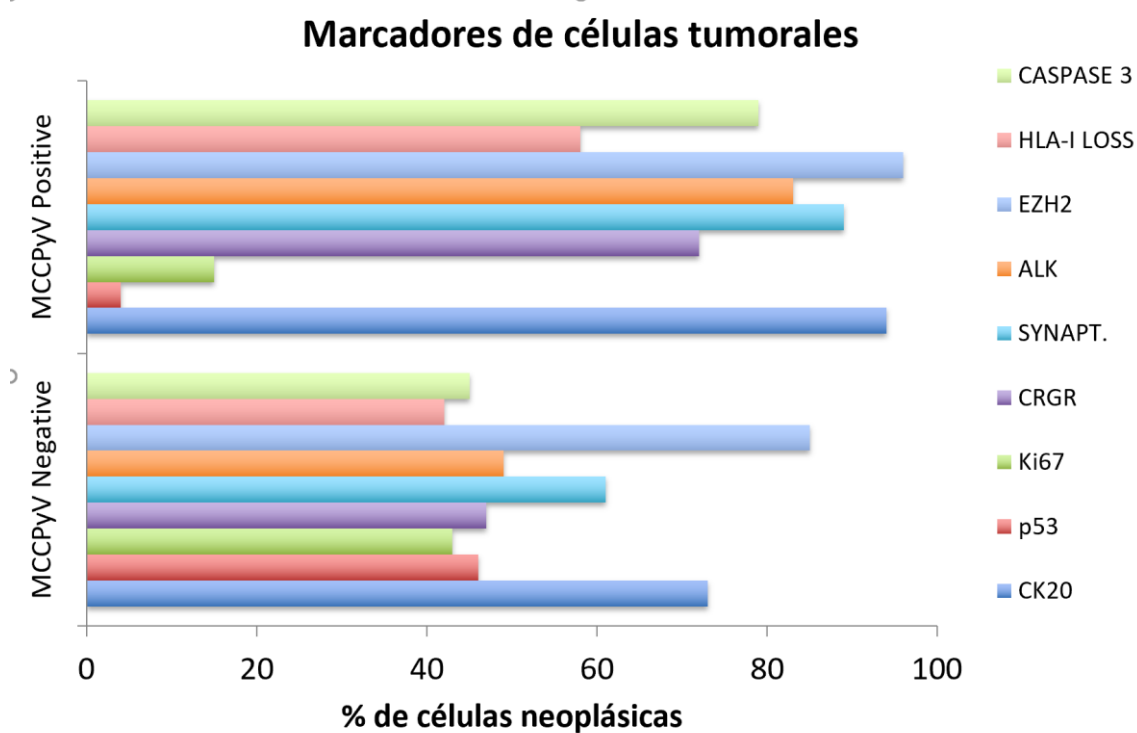


Fig. 63. Marcadores tumorales y diferencias en función de la positividad para MCPyV.

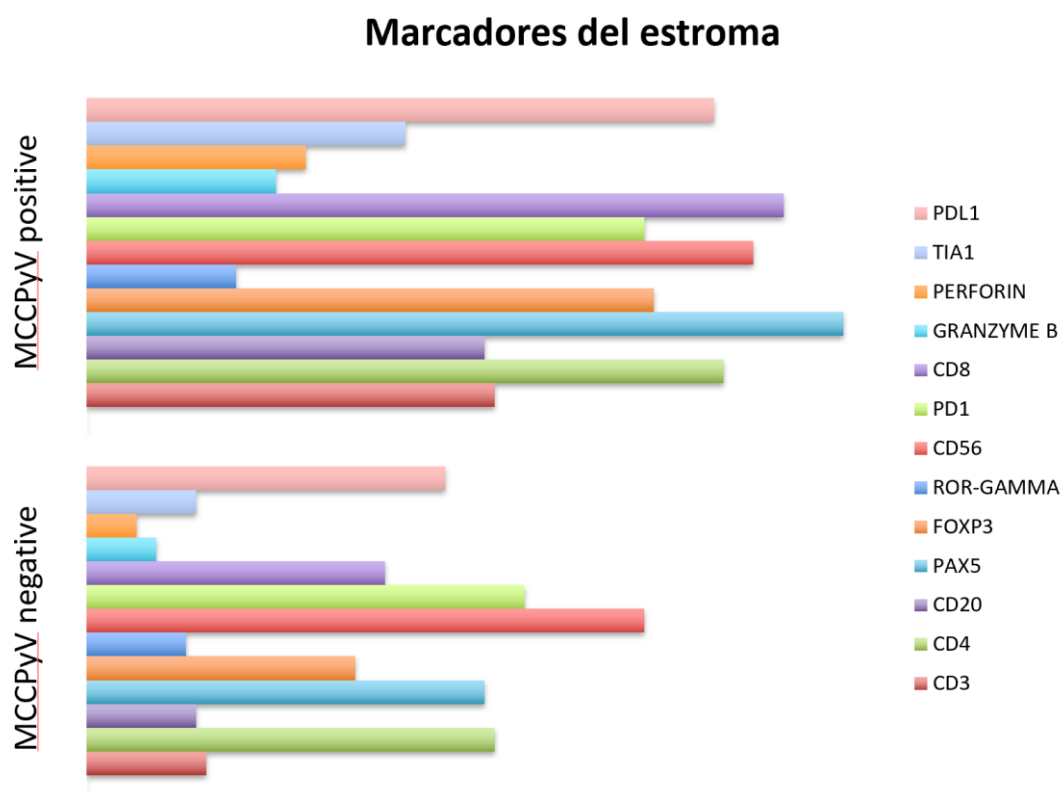


Fig. 64. Marcadores del estroma y diferencias en función de la positividad para MCPyV.

Estos hallazgos concuerdan con los descritos en publicaciones previas (1, 5, 6, 8) (34) y apoyan la conclusión de que los CCM MCPyV positivos inducen cambios oncogénicos mediante la maquinaria viral y una rica respuesta inmune parcialmente evadida a través de la pérdida de expresión de antígenos de histocompatibilidad HLA-I. En contraste, los CCM MCPyV negativos acumulan mutaciones dependientes de la radiación UV y específicamente mutaciones de TP53.

La presencia o ausencia del MCPyV permite clasificar los CCM en dos grupos: los que presentan una patogenia viral (la mayoría de ellos, aunque varía según la procedencia de los casos) y los que se deben a las mutaciones debidas a la radiación ultravioleta (la minoría). Estos tumores difieren a nivel genético (121) inmunohistoquímico (103) y biológico (26).

Estas diferencias se confirman también en el estudio de Walsh et al. (103) que analizaron 52 casos de CCM mediante cinco marcadores (CK20, CK7, cromogranina, neurofilamentos y TTF-1), y encontraron que la expresión “clásica” de marcadores se observaba sólo en los MCC puros, mientras que TTF1 y CK7 se expresaban más frecuentemente en los casos MCPyV negativos.

Estos resultados confirman la mayor expresión de p53 en los casos MCPyV negativo o, dicho de otra manera, existe una relación inversa entre la expresión de MCPyV y la presencia de p53 mutada detectable por IHQ. Estos hallazgos también concuerdan los con los descritos en otras series (110).

Los casos de CCM MCPyV negativos muestran también mayor índice proliferativo determinado con Ki67. Los casos CCM PyV positivos también presentan rasgos histopatológicos distintivos, como son la mayor frecuencia de

casos combinados, mayor intensidad de elastosis actínica y ulceración más frecuente.

Sin embargo, no todos los autores aceptan estas diferencias y algunos investigadores (43) defienden que se trata del mismo tumor con características similares. En nuestra serie, así como en otras con un tamaño de la muestra comparable (34), se observaron diferencias importantes entre los casos de CCM positivos y negativos para el MCPyV.

6.8. Cambios en el estroma inmune asociados con la presencia de MCPyV

Las 3 “E” de la inmunoeedición en cáncer son (127): La eliminación de las células tumorales, el equilibrio inmunológico con las células tumorales y el escape inmune de las células tumorales.

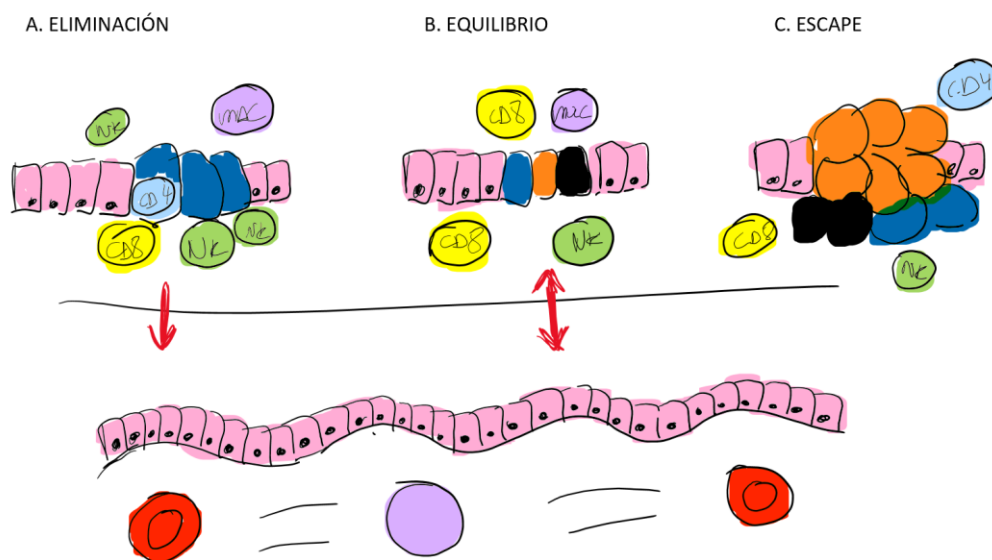


Fig. 65. Las 3 “E” de inmunoeedición en cáncer.

En nuestra serie, los casos MCPyV positivos mostraban más células inflamatorias en su estroma acompañante: linfocitos B, linfocitos T, NK y macrófagos, por lo que un tumor positivo para MCPyV facilitaría la eliminación de células tumorales, comparado con los casos MCPyV negativos.

En un estudio de Walsh et al. (48) encontraron hallazgos similares. Estos autores estudiaron la expresión de CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, Fox P3 , PD1 y CD123 en 22 casos de MCC. El aumento del infiltrado linfocitario (descrito como "TILS") se ha relacionado con la positividad de MCPyV, y tanto un infiltrado intenso como la presencia de MCPyV se han relacionado con mejores supervivencias. Estos autores postularon que el MCPyV puede ser un estímulo para el sistema inmune. Paulson et al. (47) encontraron también una correlación entre el aumento de respuesta linfocitaria intratumoral con un mejor pronóstico. Además, encontraron que un número elevado de células CD8 positivas intratumorales era un factor independiente en el pronóstico.

Los resultados del estudio de Walsh et al. (48) concuerdan con los de nuestro estudio, y el MCPyV parece desencadenar una gran respuesta inmunitaria, con un aumento de todos los marcadores del estroma.

En este mismo trabajo, esos autores no encontraron diferencias en el inmunofenotipo del infiltrado entre los tumores que regresan clínicamente y los que no lo hacen. Quizás lo que contribuye a la regresión tumoral en el CCM es la actuación conjunta de las células inflamatorias, la presencia del MCPyV y la expresión de HLA-I. Por ello, es posible que el MCPyV estimule el sistema inmune del paciente o que los CCM que se producen por mutaciones derivadas

de la radiación UV no induzcan tal estimulación inmune en el estroma acompañante.

La presencia de estas células inflamatorias en el estroma tumoral es un factor pronóstico bien conocido, de tal manera que una mayor cantidad de TILs conlleva mejor pronóstico (47).

Además, los casos de CCM MCPyV positivos expresan con mayor frecuencia marcadores citotóxicos como granzima, perforina, TIA1 y de apoptosis como caspasa 3 activa, lo que apoya también una activación del sistema inmune por parte del MCPyV. Esta relación entre marcadores citotóxicos de los TILs y la positividad para MCPyV no la hemos encontrado previamente descrita en la literatura.

Li et al. (128) describieron un incremento IFN gamma y granzima B en ratones tras la inmunoterapia. En este mismo sentido, Ollier et al. (129) observaron que líneas celulares que han perdido HLA I y que se cultivan con INF gamma pierden la posibilidad de ser invisibles para el sistema inmune y las citoquinas citotóxicas.

6.9. Posible evasión inmune con disminución de expresión de HLA I.

Para el reconocimiento de las células T, la interacción entre el péptido sui/Tab y los complejos HLA-I que se expresan en las células diana es crucial. Por lo tanto, es un hallazgo esperable que la disminución de la expresión de HLA-I en las células tumorales sea uno de los mecanismos de evasión inmune espontáneo y de respuesta a la inmunoterapia, pudiendo ser un mecanismo de resistencia a las terapias diana (130).

Parece ser que en el caso del CCM la disminución de expresión de HLA-I no está genéticamente determinada, sino que se produce como repuesta a las terapias y es potencialmente reversible (131).

Alrededor del 80% de los CCM expresan proteínas derivadas de MCPyV y se ha demostrado que estas proteínas son el sustrato de las células CD8+. Nuestros hallazgos concuerdan los de Paulson et al. (130) que encontraron que la expresión de HLA-I era menor en los CCM MCPyV positivos y este hallazgo en su caso también fue estadísticamente significativo.

Esta pérdida de HLA-I no es exclusiva del CCM y parece ser frecuente en los tumores inducidos por virus (132).

6.10. Diferencias entre los casos con regresión frente a los casos sin regresión:

Se ha definido como regresión “la completa desaparición de un tumor clínicamente evidente durante todo el periodo de seguimiento” (133).

Pero a diferencia de lo que ocurre en melanoma, no hay criterios descritos y bien definidos de regresión histológica en el CCM. Aquí hemos considerado que un CCM presentaba signos histopatológicos de regresión parcial cuando presentaba dos o más de las siguientes variables:

- Numerosos linfocitos en el infiltrado
- Presencia de colágeno esclerótico en el estroma tumoral
- Marcadores de apoptosis y citotoxicidad presentes (Caspasa 3 activa, TIA 1, granzima y perforina)

Los casos con signos histopatológicos de regresión mostraron mayor expresión de EZH2 en las células neoplásicas, así como una mayor positividad de las células estromales para marcadores de linfocitos B (PAX5 y CD20), FOXP3, PD1, y expresión mayor en los macrófagos de PDL1, CD163 y CD68. En contraste, la positividad de p53 se relacionó con ausencia de regresión.

REGRESIÓN	Marcadores Tumorales	Marcadores linfocitarios	Macrófagos
SI	EZH2 ↑	PAX5 ↑ FOXP3 ↑ CD20 ↑ PD1 ↑	CD163 ↑ CD68 ↑ PDL1 ↑
NO	P53		

Tabla 41. Resumen de las características diferenciales de los casos con presencia o ausencia de regresión.

Se estima que la regresión total en el CCM ocurre entre el 1.7% y el 3% de los casos (59). En nuestra serie, un 50% de los casos mostraban algún signo histopatológico de los que hemos considerado como expresión de regresión parcial.

En un estudio de Innoue et al. (57) se analizaron la apoptosis mediante el índice TUNEL, el índice proliferativo, la expresión de la proteína bcl-2, la expresión de p53, así como el número de linfocitos T que infiltraban el tumor. De todos estos parámetros sólo los marcadores de apoptosis y el infiltrado linfocitario mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos con regresión.

Nosotros decidimos añadir a estas dos variables estudiadas por Innoue et al. (57) (apoptosis e infiltrado linfocitario), la presencia de colágeno esclerótico, que era frecuente en los casos que presentaban regresión, estableciendo una similitud con el melanoma en que se observan áreas de fibrosis en fases avanzadas de regresión (134). Además, en varios de los casos publicados de regresión en CCM, una vez que desaparece la neoplasia, es sustituida por infiltrado linfohistiocitario y fibrosis (135).

Encontramos un porcentaje de casos más elevado con negatividad de p53 en los pacientes que presentaban regresión, probablemente porque la expresión de p53 impide que el tumor pueda regresar. En nuestra serie existía también una mayor expresión de CD20, PAX5, FOXP3 y PD1 en el infiltrado de los casos que presentaban regresión. No hemos encontrado descripciones previas de estos hallazgos en la literatura.

6.11 Estudio de supervivencia global:

En cuanto a la **supervivencia global**, se observó una relación directa entre una menor supervivencia y la edad del paciente y el estadio del tumor. Como era previsible, estadios avanzados se asociaban con supervivencias más cortas. Además, se encontraron diferencias en la expresión de CD163, ALK y EZH2, ya que una mayor expresión de ALK y EZH2 en las células neoplásicas y la presencia de mayor número de macrófagos CD163+ en el infiltrado se asociaban con supervivencias más prolongadas. El CD163 es un marcador de una subpoblación de macrófagos denominada macrófagos M2, con capacidad inmunorreguladora.

6.12. Supervivencia ligada a tumor:

En cuanto a la supervivencia ligada al tumor, los hallazgos son superponibles a la supervivencia global: se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a estadio clínico, con supervivencia ligada al tumor más larga en los casos con mayor expresión de ALK y EZH2 por parte del tumor, ausencia de necrosis y presencia en el estroma de mayor número de linfocitos CD4, TIA1 y FOXP3, así como presencia de mayor número de macrófagos CD163-positivos.

MEJOR SUPERVIVENCIA	PEOR SUPERVIVENCIA
ALK ↑ EZH2 ↑ CD4 ↑ FOXP3 ↑ TIA1 ↑ CD163 ↑	Estadio elevado Necrosis

Tabla 42. Variables que se relacionaron con mejores y peores supervivencias.

En nuestra serie, la presencia de necrosis se asociaba con una supervivencia más corta, pero no encontramos diferencias pronósticas con otras variables histopatológicas analizadas, como el patrón histopatológico, el espesor y la infiltración linfovascular, que se han descrito como factores histopatológicos de mal pronóstico en otros trabajos (36). Esta discrepancia con respecto a estudios previos puede ser debida a que el número de casos con seguimiento en nuestra serie es pequeño.

En nuestra serie, la presencia o ausencia de MCPyV no mostró relación con la supervivencia global y la ligada al tumor, hallazgo que difiere de lo observando

en otras series. De las 4 series publicadas más amplias, en tres de ellas se observó peor supervivencia en los casos MCPyV negativos. Así, Sihto et al. (80) en un estudio de 114 casos de MCC encontraron peor pronóstico en los casos MCPyV negativos, ya que la supervivencia a los 5 años era del 13% en los casos negativos frente al 45% en los casos MCPyV positivo. Resultados similares se han descrito por Nardi et al. (81) en una serie de 60 casos y por Moshiri et al. (26) en otra serie de 282 casos. En contraste, Schrama et al. (119) en un estudio de 127 pacientes no encontraron diferencias pronósticas entre los casos MCPyV positivos y negativos. Cabe destacar que en nuestra serie los casos MCPyV positivos y negativos mostraban grandes diferencias en cuanto a las medianas de supervivencia. Los casos MCPyV positivos presentaban una mediana de supervivencia de 14,46 meses, frente a una mediana de 7,56 meses en los casos MCPyV negativos, aunque estos hallazgos no tuvieron significación estadística, lo que puede deberse al escaso número de casos con seguimiento clínico (70 casos). Conviene también recordar que en las series en las que se han observado diferencias pronósticas relacionadas con la presencia o ausencia de MCPyV, este hallazgo estaba asociado con al estadiaje tumoral y no se trataba de factores independientes. Esto también se observó en nuestra serie, ya que cuanto más elevado era el estadiaje era más probable que el MCPyV fuera negativo, con diferencias estadísticamente significativas.

No hemos encontrado descripciones previas en la literatura de una relación entre ALK, CD163 y supervivencia, por lo que nuestra serie es la primera en establecer esta relación. La positividad de ALK y CD163 se asociaba claramente con mejor

supervivencia, y de hecho estos marcadores pueden ser de gran utilidad para estimar la probabilidad de supervivencia.

En cuanto a la supervivencia ligada al tumor, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en relación con el estadio clínico, la expresión de CD4, CD163, TIA1, FOXP3, ALK, EZH2 y la presencia de necrosis. No está claro el papel de FOXP3 en la supervivencia. Dowlatshahi et al. (136) no encontraron relación entre una mayor expresión de FOXP3 y un mejor pronóstico, mientras que Sihto et al. (66) observaron mayor supervivencia en los casos con expresión intensa de FOXP3. En otros tumores, como el melanoma y los cánceres de próstata, ovario y colon-recto, el aumento de expresión de FOXP3 se relaciona con peor pronóstico (136).

6.13. Limitaciones:

Entre las principales limitaciones de nuestro estudio debemos señalar que se trataba de una serie retrospectiva y muy heterogénea en la procedencia de los casos. Estos hechos han limitado la recogida de datos, por faltar algunos de ellos y la revisión de las historias clínicas.

Además, en los casos procedentes del HUMV (Santander) sólo hemos podido analizar los TMAs, con imposibilidad por lo tanto de estudiar histopatológicamente secciones completas. En los casos procedentes de Alemania sólo disponíamos de la edad, sexo y localización del tumor como únicos datos clínicos.

Finalmente, a pesar de ser una serie con un número de casos importante, sólo disponemos de datos completos de seguimiento en 70 pacientes.

Trabajos previos publicados establecen un perfil mutacional muy diferente entre los casos MCPyV positivos y negativos. En nuestra serie sólo hemos podido realizar análisis mutacional en 2 casos, por lo que no es posible establecer comparaciones con estudios previos.

Una última limitación estriba en el hecho de que los marcadores inmunohistoquímicos se han analizado en micromatrices tisulares, lo que dificulta conocer la distribución general del infiltrado linfocitario con respecto al tumor. Hemos intentado subsanar esta limitación tomando dos muestras representativas del infiltrado linfocitario en cada caso. Con esta serie tan amplia de casos y con un panel inmunohistoquímico también muy amplio habría sido muy complejo y costoso realizar este trabajo sobre secciones completas.

6.14. Futuro:

Los resultados de este estudio apoyan la heterogeneidad de los CCM, diferenciados de acuerdo a la presencia o ausencia de MCPyV determinada mediante IHC y muestran múltiples componentes del estroma tumoral susceptibles de desempeñar un papel en la respuesta inmune.

Solamente mediante trabajos adicionales de un mayor número de casos y con mejor seguimiento se podrán descifrar las siguientes incógnitas que aún persisten respecto al CCM:

- Identificación de la célula de origen del CCM
- Desarrollo de modelos animales fiables para los casos MCPyV positivos y negativos

- Estratificación por riesgo de los CCM de acuerdo con las variables identificadas en nuestro trabajo
- Identificación de marcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia
- Desarrollo de terapias basadas en modulación de la respuesta inmune (Por ejemplo, cambios en la flora intestinal, transfusión de CD8+ MCPyV+ específicas, anticuerpos diana, terapias basadas en citoquinas utilizando proteínas de fusión IL-2 o incorporación de IL-2 por medio de plásmidos).

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La presencia de MCPyV en el CCM se asocia con cambios en los perfiles de expresión de estos tumores, tanto en las células neoplásicas como en la composición celular del estroma y el infiltrado inflamatorio que acompaña al tumor.
2. Los hallazgos histopatológicos indicativos de regresión en el CCM incluyen infiltrado linfocitario intratumoral, presencia de colágeno esclerótico y positividad para marcadores citotóxicos o de apoptosis.
3. Los CCM con regresión presentan cambios en la composición celular del estroma que incluyen mayor expresión de marcadores linfocitarios e histiocitarios y ausencia de expresión de p53.
4. Los casos de CCM con hallazgos de regresión muestran una mayor supervivencia.
5. Una edad elevada y un estadio avanzado se asocia directamente con supervivencia más corta.
6. Una escasa o nula expresión de CD163, CD4, FOXP3 y TIA1 en el infiltrado inflamatorio se asocia con una menor supervivencia.
7. Una escasa o nula expresión de ALK y EZH2 en las células neoplásicas se asocia con una menor supervivencia.
8. Mediante un factor numérico que hemos denominado valor de riesgo global y que resulta de la suma de la cuantificación de ALK + cuantificación de TIA 1 + cuantificación de CD163 se puede estratificar a los pacientes con CCM respecto a sus probabilidades de supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol*.1972;105:107-110.
2. Tang CK, Toker C. Trabecular carcinoma of the skin: an ultrastructural study. *Cancer*. 1978;42(5):2311-21.
3. Becker JC, Stang A, Hausen AZ, Fischer N, DeCaprio JA, Tothill RW, et al. Epidemiology, biology and therapy of Merkel cell carcinoma: conclusions from the EU project IMMOMEC. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2018;67(3):341-51.
4. Paulson KG, Park SY, Vandeven NA, Lachance K, Thomas H, Chapuis AG, et al. Merkel cell carcinoma: Current US incidence and projected increases based on changing demographics. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(3):457-463.e2.
5. Vilar-Coromina N, Pérez Bueno F, Alsina Maqueda M, Vilardell Gil L, Izquierdo Font A, Marcos-Gragera R. [Merkel cell cancer of the skin: population-based incidence and survival, 1995-2005]. *Med Clin (Barc)*. 2009;132(18):701-703.
6. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(4):318-328.
7. Youlden DR, Soyer HP, Youl PH, Fritschi L, Baade PD. Incidence and survival for Merkel cell carcinoma in Queensland, Australia, 1993-2010. *JAMA Dermatol*. 2014;150(8):864-872.
8. Paulson KG, Nghiem P. One in a hundred million: Merkel cell carcinoma in pediatric and young adult patients is rare but more likely to present at advanced stages based on US registry data. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(6):1758-1760.
9. Merkel F. Tastzellen and Tastkoerperchen bei Den Hausthieren und beim Menschen. *Arch Mikrosc Anat* .1875;11:636-652.
10. Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his «Merkel cell», morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;271(1):225-239.
11. Xiao Y, Williams JS, Brownell I. Merkel cells and touch domes: more than mechanosensory functions? *Exp Dermatol*. 2014;23(10):692-695.
12. Sunshine JC, Jahchan NS, Sage J, Choi J. Are there multiple cells of origin of Merkel cell carcinoma? *Oncogene*. 2018;37(11):1409-1416.
13. Tilling T, Wladykowski E, Failla AV, Houdek P, Brandner JM, Moll I. Immunohistochemical analyses point to epidermal origin of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol*. 2014;141(4):407-21.
14. Sell S. On the stem cell origin of cancer. *Am J Pathol*. 2010;176(6):2584-2494.

15. Sanchez-Martin D, Uldrick TS, Kwak H, Ohnuki H, Polizzotto MN, Annunziata CM, et al. Evidence for a Mesothelial Origin of Body Cavity Effusion Lymphomas. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(9). ddx016.
16. Sauer CM, Chteinberg E, Rennspiess D, Kurz AK, Zur Hausen A. [Merkel cell carcinoma: cutaneous manifestation of a highly malignant pre-/pro-B cell neoplasia? : Novel concept about the cellular origin of Merkel cell carcinoma]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb.* 2017;68(3):204-210.
17. Liu W, Yang R, Payne AS, Schowalter RM, Spurgeon ME, Lambert PF, et al. Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host Microbe.* 2016;19(6):775-87.
18. Popp S, Waltering S, Herbst C, Moll I, Boukamp P. UV-B-type mutations and chromosomal imbalances indicate common pathways for the development of Merkel and skin squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2002;99(3):352-60.
19. Lunder EJ, Stern RS. Merkel-cell carcinomas in patients treated with methoxsalen and ultraviolet A radiation. *N Engl J Med.* 1998;339(17):1247-1248.
20. Cook M, Baker K, Redman M, Lachance K, Nguyen MH, Parvathaneni U, et al. Differential Outcomes Among Immunosuppressed Patients With Merkel Cell Carcinoma: Impact of Immunosuppression Type on Cancer-specific and Overall Survival. *Am J Clin Oncol.* 2019;42(1):82-88.
21. Engels EA, Frisch M, Goedert JJ, Biggar RJ, Miller RW. Merkel cell carcinoma and HIV infection. *Lancet Lond Engl.* 2002;359(9305):497-498.
22. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology.* 2007;120(4):435-446.
23. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008;319:1096-1100.
24. Harms PW, Harms KL, Moore PS, DeCaprio JA, Nghiem P, Wong MKK, et al. The biology and treatment of Merkel cell carcinoma: current understanding and research priorities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(12):763-776.
25. Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer.* 2009;125(6):1250-1256.
26. Moshiri AS, Doumani R, Yelistratova L, Blom A, Lachance K, Shinohara MM, et al. Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma: A More Aggressive Subtype Based on Analysis of 282 Cases Using Multimodal Tumor Virus Detection. *J Invest Dermatol.* 2017;137(4):819-827.
27. Skelton HG, Smith KJ, Hitchcock CL, McCarthy WF, Lupton GP, Graham JH. Merkel cell carcinoma: analysis of clinical, histologic, and immunohistologic features of 132 cases with relation to survival. *J Am Acad Dermatol.* 1997;37:734-739.

28. Tai P. Merkel cell cancer: update on biology and treatment. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(2):196-200.
29. Llombart B, Requena C, Cruz J. Update on Merkel Cell Carcinoma: Epidemiology, Etiopathogenesis, Clinical Features, Diagnosis, and Staging. *Actas Dermosifiliogr.* 2017;108(2):108-119.
30. Vandeven N, Lewis CW, Makarov V, Riaz N, Paulson KG, Hippe D, et al. Merkel Cell Carcinoma Patients Presenting Without a Primary Lesion Have Elevated Markers of Immunity, Higher Tumor Mutation Burden, and Improved Survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2018;24(4):963-971.
31. Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Peñas PF, et al. Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(3):375-381.
32. Jaeger T, Ring J, Andres C. Histological, immunohistological, and clinical features of Merkel cell carcinoma in correlation to Merkel cell polyomavirus status. *J Skin Cancer.* 2012;2012:983421.
33. Kuwamoto S, Higaki H, Kanai K, Iwasaki T, Sano H, Nagata K, et al. Association of Merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2011;42(5):632-640.
34. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, et al. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing Merkel cell polyomavirus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2019;32(11):1605-1616.
35. Khanna U, North JP. Large-cell variant of Merkel cell carcinoma with clear-cell change. *J Cutan Pathol.* 2020;47(1):1-5.
36. Andea AA, Coit DG, Amin B, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis. *Cancer.* 2008;113(9):2549-2558.
37. Rocamora A, Badía N, Vives R, Carrillo R, Ulloa J, Ledo A. Epidermotropic primary neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin with Pautrier-like microabscesses. Report of three cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 1987;16(6):1163-1168.
38. Jour G, Aung PP, Rozas-Muñoz E, Curry JL, Prieto V, Ivan D. Intraepidermal Merkel cell carcinoma: A case series of a rare entity with clinical follow up. *J Cutan Pathol.* 2017;44(8):684-691.
39. Al-Rohil RN, Milton DR, Nagarajan P, Curry JL, Feldmeyer L, Torres-Cabala CA, et al. Intratumoral and peritumoral lymphovascular invasion detected by D2-40 immunohistochemistry correlates with metastasis in primary cutaneous Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2018;77:98-107.
40. Falto Aizpurua LA, Wang M, Ruiz HA, Sánchez JL, Chan MP, Andea AA, et al. A case of combined Merkel cell carcinoma and squamous cell carcinoma: Molecular insights and diagnostic pitfalls. *JAAD Case Rep.* 2018;4(10):996-9.

41. Nagase K, Kimura-Kaku H, Inoue T, Shinogi T, Narisawa Y. Usefulness of ulceration and hyperkeratosis as clinical predictors of Merkel cell polyomavirus-negative and combined Merkel cell carcinoma: A retrospective study. *J Dermatol*. 2019; 46:103-109.
42. Czapiewski P, Majewska H, Kutzner H, Kazakov D, Renkielska A, Biernat W. TTF-1 and PAX5 Are Frequently Expressed in Combined Merkel Cell Carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(7):513-516.
43. Kervarrec T, Samimi M, Gaboriaud P, Gheit T, Beby-Defaux A, Houben R, et al. Detection of the Merkel cell polyomavirus in the neuroendocrine component of combined Merkel cell carcinoma. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2018;472(5):825-837.
44. Martin B, Poblet E, Rios JJ, Kazakov D, Kutzner H, Brenn T, et al. Merkel cell carcinoma with divergent differentiation: histopathological and immunohistochemical study of 15 cases with PCR analysis for Merkel cell polyomavirus. *Histopathology*. 2013;62(5):711-722.
45. Vazmitel M, Michal M, Shelekhova KV, Sima R, Mukensnabl P, Kazakov DV. Vascular changes in Merkel cell carcinoma based on a histopathological study of 92 cases. *Am J Dermatopathol*. 2008;30(2):106-111.
46. Bob A, Nielen F, Krediet J, Schmitter J, Freundt D, Terhorst D, et al. Tumor vascularization and clinicopathologic parameters as prognostic factors in Merkel cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(10):1999-2010.
47. Paulson KG, Iyer JG, Simonson WT, Blom A, Thibodeau RM, Schmidt M, et al. CD8+ lymphocyte intratumoral infiltration as a stage-independent predictor of Merkel cell carcinoma survival: a population-based study. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(4):452-458.
48. Walsh NM, Fleming KE, Hanly JG, Dakin Hache K, Doucette S, Ferrara G, et al. A morphological and immunophenotypic map of the immune response in Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2016;52:190-196.
49. Wheat R, Roberts C, Waterboer T, Steele J, Marsden J, Steven NM, et al. Inflammatory cell distribution in primary Merkel cell carcinoma. *Cancers*. 2014;6(2):1047-1064.
50. Feldmeyer L, Hudgens CW, Ray-Lyons G, Nagarajan P, Aung PP, Curry JL, et al. Density, Distribution, and Composition of Immune Infiltrates Correlate with Survival in Merkel Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016;22(22):5553-5563.
51. Kervarrec T, Gaboriaud P, Berthon P, Zaragoza J, Schrama D, Houben R, et al. Merkel cell carcinomas infiltrated with CD33+ myeloid cells and CD8+ T cells are associated with improved outcome. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(5):973-982.
52. Laniosz V, Onajin O, Sominidi-Damodaran S, Meves A, Gibson LE, Baum CL. Natural killer cell response is a predictor of good outcome in MCPyV+ Merkel cell carcinoma: A case series of 23 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(1):31-32.
53. Zaragoza J, Kervarrec T, Touzé A, Avenel-Audran M, Beneton N, Esteve E, et al. A high neutrophil-to-lymphocyte ratio as a potential marker of mortality in patients with Merkel cell carcinoma: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(4):712-721.

54. Sais G, Admella C, Soler T. Spontaneous regression in primary cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma: a rare immune phenomenon? *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2002;16(1):82-83.
55. Longo R, Balasanu O, Chastenot de Castaing M, Chatelain E, Yacoubi M, Campitiello M, et al. A Spontaneous Regression of an Isolated Lymph Node Metastasis from a Primary Unknown Merkel Cell Carcinoma in a Patient with an Idiopathic Hyper-Eosinophilic Syndrome. *Am J Case Rep*. 2018;19:1437-1440.
56. Nakamura M, Magara T, Kobayashi Y, Kato H, Watanabe S, Morita A. Heterogeneity of programmed death-ligand expression in a case of Merkel cell carcinoma exhibiting complete regression after multiple metastases. *Br J Dermatol*. 2019; 180(5):1228-1229.
57. Ahmadi Moghaddam P, Cornejo KM, Hutchinson L, Tomaszewicz K, Dresser K, Deng A, et al. Complete Spontaneous Regression of Merkel Cell Carcinoma After Biopsy: A Case Report and Review of the Literature. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(11):154-8.
58. Inoue T, Yoneda K, Manabe M, Demitsu T. Spontaneous regression of Merkel cell carcinoma: a comparative study of TUNEL index and tumor-infiltrating lymphocytes between spontaneous regression and non-regression group. *J Dermatol Sci*. 2000;24(3):203-11.
59. Walsh NM. Complete spontaneous regression of Merkel cell carcinoma (1986-2016): a 30 year perspective. *J Cutan Pathol*. 2016;43(12):1150-1154.
60. Walsh NM, Cerroni L. Merkel cell carcinoma: A review. *J Cutan Pathol*. 2020; epub ahead of print. PMID:33128463.
61. Miner AG, Patel RM, Wilson DA, Procop GW, Minca EC, Fullen DR, et al. Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma is infrequently associated with the Merkel cell polyomavirus. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2015;28(4):498-504.
62. Le MD, O'Steen LH, Cassarino DS. A Rare Case of CK20/CK7 Double Negative Merkel Cell Carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2017;39(3):208-11.
63. Lilo MT, Chen Y, LeBlanc RE. INSM1 Is More Sensitive and Interpretable than Conventional Immunohistochemical Stains Used to Diagnose Merkel Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(11):1541-1548.
64. Mitteldorf C, Berisha A, Tronnier M, Pfaltz MC, Kempf W. PD-1 and PD-L1 in neoplastic cells and the tumor microenvironment of Merkel cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2017;44(9):740-6.
65. Johansson B, Sahi H, Koljonen V, Böhling T. The expression of terminal deoxynucleotidyl transferase and paired box gene 5 in Merkel cell carcinomas and its relation to the presence of Merkel cell polyomavirus DNA. *J Cutan Pathol*. 2019;46(1):26-32.
66. Sihto H, Böhling T, Kavola H, Koljonen V, Salmi M, Jalkanen S, et al. Tumor infiltrating immune cells and outcome of Merkel cell carcinoma: a population-based study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18(10):2872-2881.

67. Busam KJ, Pulitzer MP, Coit DC, Arcila M, Leng D, Jungbluth AA, et al. Reduced H3K27me3 expression in Merkel cell polyoma virus-positive tumors. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2017;30(6):877-83.
68. Mariño-Enríquez A, Dal Cin P. ALK as a paradigm of oncogenic promiscuity: different mechanisms of activation and different fusion partners drive tumors of different lineages. *Cancer Genet.* 2013;206(11):357-373.
69. Doyle LA, Mariño-Enriquez A, Fletcher CDM, Hornick JL. ALK rearrangement and overexpression in epithelioid fibrous histiocytoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2015;28(7):904-912.
70. Dickson BC, Swanson D, Charames GS, Fletcher CD, Hornick JL. Epithelioid fibrous histiocytoma: molecular characterization of ALK fusion partners in 23 cases. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2018;31(5):753-762.
71. Coutts KL, Bemis J, Turner JA, Bagby SM, Murphy D, Christiansen J, et al. ALK Inhibitor Response in Melanomas Expressing EML4-ALK Fusions and Alternate ALK Isoforms. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(1):222-231.
72. Cao S, Nambudiri VE. Anaplastic Lymphoma Kinase in Cutaneous Malignancies. *Cancers.* 2017;9(9):123.
73. Filtenborg-Barnkob BE, Bzorek M. Expression of anaplastic lymphoma kinase in Merkel cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2013;44(8):1656-1664.
74. Veija T, Koljonen V, Bohling T, Kero M, Knuutila S, Sarhadi VK. Aberrant expression of ALK and EZH2 in Merkel cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2017;17(1):236.
75. Veija T, Kero M, Koljonen V, Böhling T. ALK and EGFR expression by immunohistochemistry are associated with Merkel cell polyomavirus status in Merkel cell carcinoma. *Histopathology.* 2019; 74 (6):829-835.
76. Wong SQ, Waldeck K, Vergara IA, Schröder J, Madore J, Wilmott JS, et al. UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCV-Negative Merkel Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 2015;75(24):5228-5234.
77. Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, Robinson DR, Wu Y-M, Dhanasekaran SM, et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 2015;75(18):3720-3727.
78. Trinidad CM, Torres-Cabala CA, Prieto VG, Aung PP. Update on eighth edition American Joint Committee on Cancer classification for Merkel cell carcinoma and histopathological parameters that determine prognosis. *J Clin Pathol.* 2019;72(5):337-340.
79. Albores-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F, Sagy N, Schwartz AM, Henson DE. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *J Cutan Pathol.* 2010;37(1):20-27.

80. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(13):938-945.
81. Nardi V, Song Y, Santamaria-Barria JA, Cosper AK, Lam Q, Faber AC, et al. Activation of PI3K signaling in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012;18(5):1227-1236.
82. Schrama D, Peitsch WK, Zapatka M, Kneitz H, Houben R, Eib S, et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2011;131(8):1631-1638.
83. Beer TW, Ng LB, Murray K. Mast cells have prognostic value in Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(1):27-30.
84. Ng L, Beer TW, Murray K. Vascular density has prognostic value in Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(5):442-445.
85. Portilla N, Alzate JP, Sierra FA, Parra-Medina R. A Systematic review and Meta-Analysis of the survival and clinicopathological features of p63 expression in Merkel cell carcinoma. *Australas J Dermatol.* 2020;61(3):e276-82.
86. Tello TL, Coggs K, Yom SS, Yu SS. Merkel cell carcinoma: An update and review: Current and future therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78(3):445-54.
87. Petrelli F, Ghidini A, Torchio M, Prinzi N, Trevisan F, Dallera P, et al. Adjuvant radiotherapy for Merkel cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2019;134:211-9.
88. Tarabackar ES, Fu T, Lachance K, Hippe DS, Pulliam T, Thomas H, et al. Narrow excision margins are appropriate for Merkel cell carcinoma when combined with adjuvant radiation: Analysis of 188 cases of localized disease and proposed management algorithm. *J Am Acad Dermatol.* 2020; epub ahead of print. PMID:32711093.
89. Garneski KM, Nghiem P. Merkel cell carcinoma adjuvant therapy: current data support radiation but not chemotherapy. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(1):166-9.
90. Bhatia S, Storer BE, Iyer JG, Moshiri A, Parvathaneni U, Byrd D, et al. Adjuvant Radiation Therapy and Chemotherapy in Merkel Cell Carcinoma: Survival Analyses of 6908 Cases From the National Cancer Data Base. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(9).
91. D'Angelo SP, Russell J, Lebbé C, Chmielowski B, Gambichler T, Grob J-J, et al. Efficacy and Safety of First-line Avelumab Treatment in Patients With Stage IV Metastatic Merkel Cell Carcinoma: A Preplanned Interim Analysis of a Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(9):e180077.
92. Joseph J, Zobniw C, Davis J, Anderson J, Trinh VA. Avelumab: A Review of Its Application in Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *Ann Pharmacother.* 2018;52(9):928-35.
93. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(10):1374-1385.

94. Shirley M. Avelumab: A Review in Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *Target Oncol.* 2018;13(3):409-416.
95. Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, Kudchadkar RR, Miller NJ, Annamalai L, et al. PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2016;374(26):2542-52.
96. Walocko FM, Scheier BY, Harms PW, Fecher LA, Lao CD. Metastatic Merkel cell carcinoma response to nivolumab. *J Immunother Cancer.* 2016;4:79.
97. Giraldo NA, Nguyen P, Engle EL, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Berry S, et al. Multidimensional, quantitative assessment of PD-1/PD-L1 expression in patients with Merkel cell carcinoma and association with response to pembrolizumab. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):99.
98. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD.* 2017;19(3):341-365.
99. Agelli M, Clegg LX. Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(5):832-841.
100. Song PI, Liang H, Wei W-Q, Jiang Y-Q, Smith JS, Qiao Y-L. The clinical profile of Merkel cell carcinoma in mainland China. *Int J Dermatol.* 2012;51(9):1054-1059.
101. Kukko H, Böhling T, Koljonen V, Tukiainen E, Haglund C, Pokhrel A, et al. Merkel cell carcinoma - a population-based epidemiological study in Finland with a clinical series of 181 cases. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2012;48(5):737-742.
102. Schadendorf D, Lebbé C, Zur Hausen A, Avril M-F, Hariharan S, Bharmal M, et al. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2017;71:53-69.
103. Pasternak S, Carter MD, Ly TY, Doucette S, Walsh NM. Immunohistochemical profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* diciembre de 2018;82:232-238.
104. Busam KJ, Jungbluth AA, Rekthman N, Coit D, Pulitzer M, Bini J, et al. Merkel cell polyomavirus expression in Merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(9):1378-1385.
105. Llombart B, Monteagudo C, López-Guerrero JA, Carda C, Jorda E, Sanmartín O, et al. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic markers. *Histopathology.* 2005;46(6):622-634.
106. D'Agostino M, Cinelli C, Willard R, Hofmann J, Jellinek N, Robinson-Bostom L. Epidermotropic Merkel cell carcinoma: a case series with histopathologic examination. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62(3):463-468.
107. Veija T, Koljonen V, Bohling T, Kero M, Knuutila S, Sarhadi VK. Aberrant expression of ALK and EZH2 in Merkel cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2017;17(1):236.

108. Veija T, Kero M, Koljonen V, Böhling T. ALK and EGFR expression by immunohistochemistry are associated with Merkel cell polyomavirus status in Merkel cell carcinoma. *Histopathology*. 2019; 74 (6):829-835.
109. Harms KL, Chubb H, Zhao L, Fullen DR, Bichakjian CK, Johnson TM, et al. Increased expression of EZH2 in Merkel cell carcinoma is associated with disease progression and poorer prognosis. *Hum Pathol*. 2017;67:78-84.
110. Husein-ElAhmed H, Ramos-Pleguezuelos F, Ruiz-Molina I, Civico-Amat V, Solis-García E, Galán-Gutierrez M, et al. Histological Features, p53, c-Kit, and Poliovirus Status and Impact on Survival in Merkel Cell Carcinoma Patients. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(8):571-9.
111. Johansson B, Sahi H, Koljonen V, Böhling T. The expression of terminal deoxynucleotidyl transferase and paired box gene 5 in Merkel cell carcinomas and its relation to the presence of Merkel cell polyomavirus DNA. *J Cutan Pathol*. 2019;46(1):26-32.
112. Zur Hausen A, Rennspiess D, Winnepeninckx V, Speel E-J, Kurz AK. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res*. 2013;73(16):4982-4987.
113. González-Vela MDC, Curiel-Olmo S, Derdak S, Beltran S, Santibañez M, Martínez N, et al. Shared Oncogenic Pathways Implicated in Both Virus-Positive and UV-Induced Merkel Cell Carcinomas. *J Invest Dermatol*. 2017;137(1):197-206.
114. Wetzels CTAH, Hoefnagel JGM, Bakkers JMJE, Dijkman HBPM, Blokx WAM, Melchers WJG. Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung. *PLoS One*. 2009;4(3):e4958.
115. Chun SM, Yun SJ, Lee S-C, Won YH, Lee J-B. Merkel cell polyomavirus is frequently detected in Korean patients with Merkel cell carcinoma. *Ann Dermatol*. 2013;25(2):203-7.
116. Leroux-Kozal V, Lévêque N, Brodard V, Lesage C, Dudev O, Makeieff M, et al. Merkel cell carcinoma: histopathologic and prognostic features according to the immunohistochemical expression of Merkel cell polyomavirus large T antigen correlated with viral load. *Hum Pathol*. 2015;46(3):443-53.
117. Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4645-53.
118. Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):246-8.
119. Schrama D, Peitsch WK, Zapatka M, Kneitz H, Houben R, Eib S, et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1631-8.

120. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(13):938-45.
121. Harms PW, Patel RM, Verhaegen ME, Giordano TJ, Nash KT, Johnson CN, et al. Distinct gene expression profiles of viral- and nonviral-associated Merkel cell carcinoma revealed by transcriptome analysis. *J Invest Dermatol.* 2013;133(4):936-45.
122. Foulongne V, Kluger N, Dereure O, Brieu N, Guillot B, Segondy M. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(9):1491-3.
123. Kassem A, Schöpflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, et al. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res.* 2008;68(13):5009-13.
124. Katano H, Ito H, Suzuki Y, Nakamura T, Sato Y, Tsuji T, et al. Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* 2009;81(11):1951-8.
125. Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4645-53.
126. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, et al. Diagnostic accuracy of a panel of immunohistochemical and molecular markers to distinguish Merkel cell carcinoma from other neuroendocrine carcinomas. *Mod Pathol* 2019; epub ahead of print. PMID:30349028.
127. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60.
128. Li C, Zhang N, Zhou J, Ding C, Jin Y, Cui X, et al. Peptide Blocking of PD-1/PD-L1 Interaction for Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(2):178-88.
129. Ollier J, Kervarrec T, Samimi M, Benlalam H, Aumont P, Vivien R, et al. Merkel cell carcinoma and cellular cytotoxicity: sensitivity to cellular lysis and screening for potential target antigens suitable for antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother CII.* 2018;67(8):1209-19.
130. Ritter C, Fan K, Paschen A, Reker Hardrup S, Ferrone S, Nghiem P, et al. Epigenetic priming restores the HLA class-I antigen processing machinery expression in Merkel cell carcinoma. *Sci Rep.* 2017;7(1):2290.
131. Paulson KG, Tegeder A, Willmes C, Iyer JG, Afanasiev OK, Schrama D, et al. Downregulation of MHC-I expression is prevalent but reversible in Merkel cell carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(11):1071-9.
132. Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(7):503-13.

133. Connelly TJ, Cribier B, Brown TJ, Yanguas I. Complete spontaneous regression of Merkel cell carcinoma: a review of the 10 reported cases. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al.* 2000;26(9):853-6.
134. Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. [Problems in defining melanoma regression and prognostic implication]. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100(9):759-66.
135. Maruo K, Kayashima KI, Ono T. Regressing Merkel cell carcinoma-a case showing replacement of tumour cells by foamy cells. *Br J Dermatol.* 2000;142(6):1184-9.
136. Dowlathshahi M, Huang V, Gehad A, Jiang Y, Calarese A, Teague JE, et al. Tumor-specific T cells in human Merkel cell carcinomas: a possible role for Tregs and T cell exhaustion in reducing T cell responses. *J Invest Dermatol.* 2013;133(7):1879-89.